

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, G01N
33/577, 33/68, C12N 5/10, 1/21 // (C12N
1/21, C12R 1:19)

A2

(11) Numéro de publication internationale:

WO 97/35973

(43) Date de publication internationale:

2 octobre 1997 (02.10.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00537

(22) Date de dépôt international: 26 mars 1997 (26.03.97)

(30) Données relatives à la priorité:

96/03730

26 mars 1996 (26.03.96)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): VETIGEN
[FR/FR]; 21, rue Sébastien-Mercier, F-75015 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LENZEN, Ger-
linde [DE/FR]; 55, rue des Cévennes, F-75015 Paris
(FR). PIETRI-ROUXEL, France [FR/FR]; 69, boulevard
Brune, F-75014 Paris (FR). DRUMARE, Marie-Françoise
[FR/FR]; 87 bis, boulevard Jean-Jaurès, F-94280 Fresnes
(FR). STROSBURG, Arthur, Donny [BE/FR]; 66, rue de
Javel, F-75015 Paris (FR).(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008
Paris (FR).(81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès
réception de ce rapport.(54) Title: CANINE β 2- AND β 3-ADRENERGIC RECEPTORS AND USE THEREOF(54) Titre: RECEPTEURS β 2- ET β 3-ADRENERGIQUES CANINS ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract

Nucleotide sequences coding for certain canine β -adrenergic receptors, particularly the β 2- (SEQ ID NO 1) and β 3- (SEQ ID NO 24) receptors, as well as the use of said sequences as probes, for expressing canine β -adrenergic receptors, for studying the tissue location of the expressed receptor (PCR, Northern blot), for carrying out directed mutagenesis, and for receptor structure-function studies, are disclosed. The use of said canine β -adrenergic receptors for preparing specific antibodies is also disclosed. Furthermore, a differential screening method for affinity studies of substances having an agonist or antagonist activity for canine β 3-adrenergic receptors, and kits for studying the effectiveness of various substances for said canine β 3-adrenergic receptors, are disclosed. Such substances are particularly useful for selectively treating obesity or other obesity-related metabolic disorders in dogs, as well as any other diseases in which canine β 3 receptors are involved.

(57) Abrégé

Séquences nucléotidiques codant pour certains récepteurs β -adrénergiques canins, notamment les récepteurs β 2- (SEQ ID NO 1) et les récepteurs β 3- (SEQ ID NO 24), ainsi qu'à l'utilisation de ces séquences comme sondes, pour l'expression des récepteurs β -adrénergiques canins, pour étudier la localisation tissulaire du récepteur exprimé (PCR, Northern blot), pour effectuer des mutagenèses dirigées et pour l'étude structure-fonction des récepteurs. Utilisation desdits récepteurs β -adrénergiques canins pour la préparation d'anticorps spécifiques. Procédé de criblage différentiel pour l'étude en affinité de substances, à action agoniste ou antagoniste vis-à-vis des récepteurs β 3-adrénergiques canins et trousse ou kits pour l'étude de l'efficacité de différentes substances pour lesdits récepteurs β 3-adrénergiques canins. De telles substances sont notamment utilisées pour le traitement sélectif de l'obésité des chiens ou d'autres troubles métaboliques liés à l'obésité ou à toute autre pathologie faisant intervenir les récepteurs β 3 canins.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bresil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

RECEPTEURS BETA-2 ET BETA-3 ADRENERGIQUES CANINS ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention est relative à des
5 séquences nucléotidiques codant pour certains récepteurs
 β -adrénergiques canins, notamment les récepteurs β 2- et
les récepteurs β 3-, ainsi qu'à l'utilisation de ces
séquences comme sondes, pour l'expression des récepteurs
 β -adrénergiques canins, pour étudier la localisation
10 tissulaire du récepteur exprimé (PCR, Northern blot),
pour effectuer des mutagenèses dirigées et pour l'étude
structure-fonction des récepteurs.

La présente invention est également relative à
l'utilisation desdits récepteurs β -adrénergiques canins
15 pour la préparation d'anticorps spécifiques.

La présente invention est également relative à
un procédé de criblage différentiel de substances, à
l'action agoniste ou antagoniste vis-à-vis des récepteurs
 β 3-adrénergiques canins et à des troussees ou kits pour la
20 détection du degré d'affinité de différentes substances
pour lesdits récepteurs β 3-adrénergiques canins. De
telles substances sont notamment utilisées pour le trai-
tement sélectif de l'obésité des chiens ou d'autres trou-
bles métaboliques liés à l'obésité ou à toute autre
25 pathologie faisant intervenir les récepteurs β 3 canins.

Il est connu que les catécholamines telles que
l'adrénaline et la noradrénaline, les agonistes synthé-
tiques des récepteurs β -adrénergiques, qui miment leurs
fonctions biologiques et les antagonistes, qui bloquent
30 ces fonctions biologiques, exercent leurs effets en se
liant à des sites de reconnaissance (récepteurs membra-
naires) spécifiques, situés dans les membranes plasmiques
des cellules.

Deux classes principales de récepteurs adrénergiques ont été définies, les récepteurs adrénergiques α et les récepteurs adrénergiques β .

Dans l'ensemble de ces deux classes, on distingue, maintenant, cinq sous-types de récepteurs aux catécholamines ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ -RA). Leurs gènes ont été récemment isolés et identifiés (S. COTECCHIA et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7159-7163 ; B.K. KOBILKA et al., 1987, Science, 238, 650-656 ;
10 T. FRIELLE et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7920-7924 ; L.J. EMORINE et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 6995-6999 ; L.J. EMORINE et al., 1989, Science, 245, 1118-1121). L'analyse de ces gènes a permis de reconnaître leur appartenance à une famille de récepteurs membranaires intégraux présentant certaines homologies (R.A.F. DIXON et al., 1988, Annual Reports in Medicinal Chemistry, 221-233 ; L.J. EMORINE et al., 1988, Proc. NATO Adv. Res. Workshop), notamment au niveau de 7 régions transmembranaires, qui sont couplées à des protéines régulatrices, appelées protéines G, susceptibles
20 de fixer des molécules de guanosine triphosphate (GTP).

Ces récepteurs membranaires, lorsqu'ils ont fixé le ligand approprié (agoniste ou antagoniste), subissent un changement de conformation, qui induit
25 (agoniste) ou bloque (antagoniste) un signal intracellulaire, qui modifie le comportement de la cellule cible.

Dans le cas où des agonistes se lient à des récepteurs β -adrénergiques (RA- β), ils activent une classe de protéines G, qui stimule à son tour l'activité de l'adénylyl cyclase, alors que les antagonistes se lient à
30 des RA- β , mais n'activent pas l'adénylyl cyclase.

Lorsque l'adénylyl cyclase est activée, elle catalyse la production d'un médiateur intracellulaire ou second messenger, notamment l'AMP cyclique.

Les Inventeurs ont participé à la mise en évidence de nouveaux récepteurs β -adrénergiques chez l'homme, dénommés RA-Hu β 3, chez la souris (Demande Internationale WO 92/12246), dénommés RA-Mu β 3 et chez les
5 bovins (Demande Internationale WO 94/24162), dénommés RA-Bo β 3, caractérisés par des propriétés différentes de celles des récepteurs β 1 et β 2, notamment en ce qu'ils se comportent de façon différente vis-à-vis de substances respectivement antagonistes et agonistes des récepteurs
10 β 1 et β 2 (Demande Internationale WO 90/08775).

Le récepteur RA-Hu β 3 est plus particulièrement constitué par une séquence de 408 amino-acides (VAN SPRONSEN A. et al., Eur. J. Biochem., 1993, 213, 1117-1124) et est considéré comme comportant sept régions
15 transmembranaires hydrophobes séparées par des boucles hydrophiles intra- et extra-cellulaires et le récepteur RA-Mu β 3 est constitué par une séquence de 400 amino-acides (VAN SPRONSEN et al., précité) alors que le récepteur RA-Bo β 3 est constitué par une séquence de 405 amino-
20 acides, ces deux dernières séquences comportant également sept régions transmembranaires.

Les travaux antérieurs concernant le RA-Hu β 3, le RA-Mu β 3 et le RA-Bo β 3 ont montré que le récepteur β -adrénergique intervient dans les maladies telles que le
25 diabète et/ou l'obésité ; il est préférentiellement exprimé dans le tissu adipeux qui joue un rôle important dans le métabolisme.

Un certain nombre de travaux ont mis en évidence l'existence *in vivo* de récepteurs β 2 et β 3 adrénér-
30 giques canins ; toutefois, il n'avait pas été possible jusqu'à présent d'isoler ni les séquences codantes, ni ces récepteurs β 2 et β 3 adrénér-
giques canins, toutes les tentatives en ce sens ayant échoué (CHAMPIGNY O. et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 10774-10777 ;
HOLLOWAY B.R. et al., Int. J. Obes., 1985, 9, 423-432 ;
HOLLOWAY B.R. et al., Br. J. Pharmacol., 1991, 104, 97-
104 ; VALLET P. et al., J. Pharmacol. and Exp. Therap.,
5 1988, 249(1), 271-277 ; TAOUIS M. et al., J. Pharmacol.
and Exp. Therap., 1987, 242(3), 1041-1049 ; ASHWELL M.,
Int. J. Obes., 1987, 11(4), 357-365 ; LANGIN D. et al.,
Eur. J. Pharmacol., 1991, 199, 291-301).

Poursuivant leurs travaux dans cette voie, les
10 Inventeurs ont cherché à mettre en évidence un tel récep-
teur adrénergique $\beta 3$ chez les chiens (RA-Ca $\beta 3$) et à le
distinguer des autres récepteurs β -adrénergiques (RA- $\beta 2$,
notamment), afin de mettre au point des agents thérapeu-
tiques spécifiques au chien.

15 La présente invention a pour objet des séquen-
ces nucléotidiques isolées, caractérisées en ce qu'elles
correspondent à une séquence d'ADN codant pour un récep-
teur β -adrénergique canin sélectionné dans le groupe
constitué par l'ADNc codant pour le récepteur $\beta 2$ -
20 adrénérergique canin, de séquence SEQ ID NO:1 et par l'ADN
codant pour le récepteur $\beta 3$ -adrénérergique canin, de
séquence SEQ ID NO:24.

Dans le cadre de la présente invention, les
récepteurs $\beta 3$ et $\beta 2$ adrénérergiques canins ont effectivement
25 été isolés, ce qui donne la possibilité soit de mettre au
point des traitements sélectifs pour les chiens après
définition d'un profil pharmacologique distinct de celui
défini pour les récepteurs $\beta 3$ humains, murins et bovins,
soit de disposer de produits spécifiques d'un sous-type
30 de récepteur : $\beta 3$ canin spécifique ou $\beta 2$ canin spécifique.

Le fait d'avoir effectivement isolé à la fois
le récepteur $\beta 3$ - et le récepteur $\beta 2$ -adrénérergiques canins,
permet d'utiliser ce dernier en tant que témoin de compa-
raison pour la mise au point de traitements spécifiques

du chien, dans les maladies concernées par le récepteur $\beta 3$ -adrénergique (obésité essentiellement).

La présente invention a également pour objet des sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus ou un fragment de celle-ci, marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

Les conditions d'hybridation des sondes sont définies comme suit :

Pour les sondes les plus courtes, c'est-à-dire d'environ 10 à environ 100 nucléotides, des conditions d'hybridation appropriées sont les suivantes :

* conditions d'hybridation des sondes $\beta 3$:

en présence d'une solution contenant 600 mM de NaCl ; 60 mM de citrate de sodium ; 8 mM de Tris-HCl, pH 7,5 ; 50 mM de phosphate de sodium ; 1 % de Ficoll ; 1 % de polyvinylpyrrolidone ; 1 % de sérum albumine bovine ; 10 à 25 % de formamide ; 0,2 % de S.D.S. (sodium dodécylsulfate) ; 10 μ g/ml d'ADN de sperme de saumon, pendant 12 à 16 heures à 42°C.

Les lavages sont effectués dans une solution contenant 3 mM de NaCl ; 0,3 mM de citrate de sodium ; 0,05 % de S.D.S., à 50°C, pendant 30 minutes à 1 heure.

* Conditions d'hybridation des sondes $\beta 2$:

en présence d'une solution contenant 600 mM de NaCl ; 60 mM de citrate de sodium ; 8 mM de Tris-HCl, pH 7,5 ; 50 mM de phosphate de sodium ; 1 % de Ficoll ; 1 % de polyvinylpyrrolidone ; 1 % de sérum albumine bovine ; 10 à 25 % de formamide ; 0,2 % de S.D.S. ; 10 μ g/ml d'ADN de sperme de saumon, pendant 12 à 16 heures à 42°C.

Les lavages sont effectués dans une solution contenant 15 mM de NaCl ; 1,5 mM de citrate de sodium ; 0,05 de S.D.S., à 45°C, pendant 45 min.

Pour les sondes plus longues, c'est-à-dire présentant plus de 100 nucléotides, des conditions d'hybridation appropriées sont celles indiquées précédemment pour les sondes plus courtes, mais dans lesquelles
5 le milieu sus-défini contient 40 à 50 % de formamide au lieu de 10 à 25 %.

Dans les conditions exposées ci-dessus, les sondes issues de la SEQ ID N°1 ne s'hybrident qu'avec les récepteurs RA-Ca β 2, alors que les sondes issues de la SEQ
10 ID N° 24 ne s'hybrident qu'avec le récepteur RA-Ca β 3.

La présente invention a également pour objet des protéines (récepteurs β 2- et β 3-adrénergiques), caractérisées en ce qu'elles sont codées par une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus et sont sélectionnées dans le groupe constitué par la SEQ ID NO:2
15 (récepteur RA-Ca β 2) et la SEQ ID NO:25 (RA-Ca β 3).

Les récepteurs β 2 et β 3 canins activent l'adénylyl cyclase ; toutefois, le couplage entre les récepteurs et l'adénylyl cyclase par l'intermédiaire des protéines G, est déficient dans des cellules murines CHO-K1 (réf.: ATCC CRL 9618, ATCC Catalogue of Cell lines & Hybridomas, 7ème édition, 1992) et CHW, en ce qui concerne le récepteur β 2 canin et CHO-K1, pour le récepteur β 3 canin. Cela implique une perte d'activité des récepteurs β 2- et β 3-adrénergiques canins dans ces cellules,
25 bien qu'ils y soient effectivement exprimés.

L'activité du récepteur β 3 canin exprimé dans les cellules CHO-K1 se distingue de l'activité β 3 d'autres espèces (homme, boeuf), exprimé dans les mêmes
30 cellules, en ce qu'elle est nulle lorsque le récepteur est cloné et exprimé dans des cellules CHO-K1, alors qu'elle est forte, quand il est exprimé dans les cellules de singe COS-1 (réf.: ATCC CRL 1650, ATCC Catalogue of Cell lines & Hybridomas, 7ème édition, 1992).

Ledit récepteur présente, dans les cellules COS-1, dans lesquelles il y a à la fois expression et couplage corrects, les activités des récepteurs $\beta 3$ -adrénergiques, à savoir, il active l'adénylyl cyclase en présence de l'un des agoniste suivants : (-)-isoprotérénol, (-)-épinéphrine, (-)-norépinéphrine, CGP12177A, CL316,243.

La présente invention a également pour objet des fragments desdites protéines d'au moins 6 amino-
10 acides, correspondant à un épitope apte à produire des anticorps dans des conditions convenables, telles que décrites dans GUILLAUME JL. et al. (Eur. J. Biochem., 1994, 224, 761-770)

La présente invention a également pour objet
15 des anticorps dirigés spécifiquement contre le récepteur $\beta 3$ -adrénergique canin ou contre l'un de ses épitopes, lesquels anticorps ne reconnaissent que ledit récepteur $\beta 3$ -adrénergique canin ou l'un de ses épitopes et ne reconnaissent ni les récepteurs $\beta 1$ -, ni les récepteurs $\beta 2$ -
20 adrénergiques canins.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique conforme à l'invention.

25 On entend, au sens de la présente invention, par vecteur recombinant, aussi bien un plasmide, un cosmide, qu'un phage.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur, il est constitué par un vecteur recombinant approprié, comprenant en particulier une origine de réplique
30 cation dans un micro-organisme hôte convenable, notamment une bactérie ou une cellule eucaryote, au moins un gène dont l'expression permet la sélection soit des bactéries, soit des cellules eucaryotes ayant reçu ledit vecteur,
35 une séquence régulatrice appropriée, notamment un promoteur permettant l'expression des gènes dans lesdites bac-

téries ou cellules eucaryotes, et dans lequel vecteur est insérée une séquence nucléotidique ou un fragment de séquence tels que définis ci-dessus, lequel vecteur est un vecteur d'expression d'un récepteur $\beta 2$ - ou $\beta 3$ -
5 adrénérgique canin.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit vecteur est constitué d'un plasmide recombinant d'expression dans lequel est insérée, au niveau d'un lieu multisite, la séquence codant pour le
10 récepteur $\beta 2$ - ou le récepteur $\beta 3$ -adrénérgique canin ; un plasmide contenant la séquence codant pour le récepteur $\beta 3$ -adrénérgique canin a été dénommé pcDNA3/r $\beta 3$ adrénérgique canin ou « Beta3 canine-ADR » et a été déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-
15 organismes (CNCM) tenue par l'INSTITUT PASTEUR, en date du 9 février 1996 sous le n° I-1672 ; un plasmide contenant la séquence codant pour le récepteur $\beta 2$ -adrénérgique canin a été dénommé pcDNA3/r $\beta 2$ -adrénérgique.

La présente invention a également pour objet
20 une cellule hôte appropriée, obtenue par transformation génétique, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un plasmide recombinant d'expression, conforme à l'invention.

Une telle cellule est capable d'exprimer une
25 protéine, d'origine canine, ayant une activité de récepteur $\beta 2$ - ou $\beta 3$ -adrénérgique.

Selon un mode de réalisation avantageux, la cellule hôte est notamment constituée par les cellules CHO-K1 (expression stable non couplée à l'activité adénylyl cyclase) et COS-1 (expression transitoire et couplage à l'adénylyl cyclase).
30

Un autre des micro-organismes utilisés peut être constitué par une bactérie, notamment *Escherichia coli*.

De manière avantageuse, les récepteurs selon l'invention constituent un outil pour la détection de ligands spécifiques intervenant dans l'activation ou l'inhibition de ces récepteurs et permettent d'identifier
5 et de sélectionner des ligands β -adrénergiques spécifiques des récepteurs $\beta 3$ canins, en comparant les résultats obtenus à l'aide à la fois des séquences codant pour le récepteur $\beta 2$ - et des séquences codant pour le récepteur $\beta 3$ -adrénergique canin.

10 Conformément à l'invention, le procédé de criblage différentiel pour l'étude de l'affinité en liaison de substances et la sélection et l'identification de substances capables de se comporter comme ligand spécifique vis-à-vis d'un récepteur $\beta 3$ -adrénergique canin
15 conforme à l'invention comprend :

- la mise en contact de ladite substance avec
une cellule hôte préalablement transformée par un plasmide recombinant d'expression tel que défini ci-dessus, laquelle cellule hôte exprime ledit récepteur adrénér-
20 que $\beta 3$ canin, le cas échéant après induction physique ou chimique appropriée, et permet le couplage adénylyl cyclase/récepteur par l'intermédiaire des protéines G, laquelle mise en contact est réalisée dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre le récepteur
25 et ladite substance s'il y a lieu,

- la mise en contact de ladite substance avec une cellule hôte préalablement transformée par un plasmide recombinant d'expression du récepteur $\beta 2$ -adrénér-
gique canin, et

- 30 - la détection de la formation éventuelle d'un complexe du type ligand-protéine.

Un tel procédé permet de définir le profil pharmacologique du récepteur soit $\beta 3$ canin (lorsque la substance étudiée est mise en contact avec le récepteur

$\beta 3$), soit $\beta 2$ canin (lorsque la substance étudiée est mise en contact avec le récepteur $\beta 2$). L'analyse et la comparaison de ces deux profils permettent de mettre en évidence les ligands spécifiques de chacun des sous-types.

5 La présente invention a, en outre, pour objet un procédé pour l'étude de l'efficacité d'une substance ayant une activité soit agoniste, soit antagoniste, vis-à-vis du récepteur étudié, lequel procédé comprend :

- la transformation d'une cellule hôte appropriée par un plasmide recombinant d'expression conforme à l'invention exprimant le récepteur $\beta 3$ -adrénergique canin ;

15 - la culture de la cellule hôte transformée, dans des conditions permettant l'expression du récepteur $\beta 3$ codé par la séquence nucléotidique, et le transfert du récepteur $\beta 3$ exprimé vers la membrane de ladite cellule, de sorte que les séquences transmembranaires du récepteur $\beta 3$ soient exposées à la surface de la cellule hôte transformée ;

20 - la mise en contact de ladite cellule hôte transformée avec ladite substance ; et

- la mesure de l'accumulation du second messager AMPc, induite par la liaison de ladite substance sur son récepteur et la stimulation de l'effecteur adénylyl cyclase par l'intermédiaire d'une protéine G.

25 L'invention a, en outre, pour objet un kit pour la détection de l'affinité de liaison éventuelle d'un ligand pour un récepteur conforme à l'invention et/ou pour la détection de l'activité dudit ligand vis-à-vis du récepteur étudié, lequel kit comprend :

30 - une culture de cellules hôtes transformées par un plasmide recombinant d'expression conforme à l'invention ;

- éventuellement, si nécessaire, des moyens
35 physiques ou chimiques pour induire l'expression d'un

récepteur $\beta 3$ canin codé par une séquence nucléotidique conforme à l'invention, contenue dans un plasmide recombinant dont le promoteur est inductible ;

- un ou plusieurs ligands témoins ayant des
5 affinités déterminées pour ledit récepteur $\beta 3$;

- l'affinité de ladite substance pour le récepteur est mesurée par compétition de la liaison du radioligand par des concentrations croissantes de ladite substance ; et

10 - des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de l'activité biologique dudit ligand sur le récepteur $\beta 3$ exprimé.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, avec référence aux
15 dessins annexés dans lesquels :

* en ce qui concerne le récepteur $\beta 3$ -adrénergique canin :

- la figure 1 représente schématiquement la
20 séquence codant pour le récepteur $\beta 3$ -adrénergique canin et l'emplacement des amorces humaines pour la mise en œuvre d'une PCR ;

- les figures 2A et 2B représentent la visualisation du produit d'amplification, à partir d'ADN génomique d'un fragment de séquence codant pour le récepteur
25 $\beta 3$ -adrénergique ;

- les figures 3A et 3B représentent des Southern blots de l'ADN génomique de chien, hybridé avec une sonde RA- $\beta 3$ canin ;

30 - la figure 4 représente une carte de restriction de l'ADN génomique canin comportant le gène $\beta 3$ -adrénergique canin (zone noircie) ;

- la figure 5 représente un gel d'agarose obtenu à partir d'ADN génomique canin coupé par EcoRI et
35 fractionné en tailles différentes entre 8 et 4,8 Kb ;

- la figure 6 représente un *Southern blot* du gel d'agarose de la figure 5 et montre que le gène codant pour le RA- β 3 canin est contenu majoritairement dans la fraction n° 2 ;

5 - les figures 7 et 8 représentent les sites de restriction uniques contenus dans le fragment de 2649 pb contenant la séquence codant pour le RA- β 3 canin ;

- la figure 9 est une comparaison des séquences en acides aminés entre RA-Ca β 3 et RA-Hu β 3 ;

10 - la figure 10 représente une expérience réalisée avec l'un des deux clones stables CHO-K1 sélectionnés, exprimant le récepteur β 3 canin ;

- la figure 11 représente une expérience réalisée avec l'un des deux clones stables HEK293 sélectionnés, exprimant le récepteur β 3-canin ;

15 * en ce qui concerne le récepteur β 2-adrénergique canin :

- les figures 12 et 13 représentent les sites de restriction uniques contenus dans le fragment de 2679 pb, contenant la séquence codant pour le RA- β 2 canin ;

- la figure 14 est une comparaison des différents récepteurs β 2 ; et

25 - la figure 15 représente une expérience typique réalisée avec deux sous-clones exprimant le récepteur β 2 canin et un clone exprimant le récepteur β 2 humain.

Exemple 1 : Mise en évidence d'un récepteur β 3-adrénergique chez le chien.

1) Amplification d'un fragment du gène β 3 canin par PCR :

Des expériences d'amplification par PCR ont été réalisées sur ADN génomique canin, en utilisant comme amorces deux oligonucléotides, synthétisés à partir de la séquence β 3-adrénergique humaine. Le premier, dénommé

1269 (SEQ ID NO:26) correspond au début de la partie codante du gène canin. Le second, dénommé 1263 (SEQ ID NO:9) et comprenant également 18 nucléotides, correspond à une partie codant pour le cinquième segment transmembranaire du récepteur, comme illustré à la figure 1, dans laquelle la localisation des oligonucléotides (▶ et ◀) utilisés comme amorces pour la réaction PCR est représentée.

La réaction PCR réalisée dans les conditions telles que définies en 2) ci-après permet d'obtenir un fragment amplifié d'environ 643 paires de bases, c'est-à-dire du même ordre de grandeur que le fragment humain correspondant. Ce fragment est visualisé par détection d'une fluorescence, résultant de la fixation de bromure d'éthidium après migration électrophorétique en gel d'agarose. La taille du fragment est déterminée à l'aide de marqueurs de poids moléculaires connus. Sur la figure 2 on voit effectivement un fragment à la taille attendue correspondant à une partie du gène du récepteur $\beta 3$ -adrénergique canin.

La figure 2A, correspond à la visualisation par fluorescence en bromure d'éthidium des fragments obtenus après amplification sur ADN génomique humain (Hu) et de chien (Dg). Les marqueurs de taille (MW) sont des multiples de 123 pb (BRL). La figure 2B correspond aux résultats de l'hybridation avec une sonde humaine $\beta 3$ spécifique.

Ces résultats montrent une forte homologie entre les récepteurs $\beta 3$ -adrénergique canin et humain, du fait que le fragment amplifié correspond à la région amino-terminale et aux cinq premiers domaines transmembranaires qui sont les parties les mieux conservées dans les divers récepteurs couplés aux protéines liant le GTP.

Toutefois, les particularités du couplage récepteur-adénylyl cyclase illustrent l'utilité et la

nécessité de tels récepteurs $\beta 3$ -adrénergiques canins pour les applications précitées.

**2) Clonage d'une partie du gène $\beta 3$ adrénér-
gique canin par PCR :**

5 Le fragment de 643 pb, observé en 1) est cloné par la méthode dite "RT-PCR" (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction).

Pour ce faire, les ARN totaux sont extraits de tissu adipeux brun de chiots, par la méthode utilisant le
10 thiocyanate de guanidium, puis on purifie les ARN messagers poly A+, à l'aide de colonnes oligo(dT) (Pharmacia réf. 27-9258-A).

On synthétise de l'ADNc, à partir de 0,5 μ g dudit ARNm poly A+, à l'aide de la transcriptase inverse
15 du virus de la leucémie murine de Moloney (M-MLV Gibco-BRL réf. 510-8025 SA), puis on amplifie cet ADNc par PCR, à l'aide des deux amorces humaines utilisées en 1) [oligonucléotides 1269 (SEQ ID NO:26) (amorce sens) et 1263 (SEQ ID NO:9) (amorce anti-sens)].

20 Les conditions de mise en oeuvre de la réaction PCR sont les suivantes :

On ajoute à l'ADNc néosynthétisé, une solution contenant les amorces SEQ ID NO:26 et SEQ ID NO:9 à une concentration de 0,25 μ M chacune, 10 % de diméthyl-
25 sulfoxyde, 2,5 U de Taq polymérase (Cetus^R, Perkin Elmer), les différents dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), chacun à une concentration de 0,25 mM ; le tampon de réaction utilisé est celui préconisé par Perkin Elmer.

La PCR est réalisée sur un appareil Perkin
30 Elmer "Gene Amp PCR System 9600", dans les conditions suivantes :

Après une étape de dénaturation initiale (2 min. à 94°C), on réalise 29 cycles comme suit : 15 sec. à 94°C ; 30 sec. à 56°C ; 30 sec. à 72°C et en dernier une
35 fois 3 min. à 72°C.

Pour obtenir un rendement important en fragment amplifié, après avoir obtenu le fragment attendu, on procède à une nouvelle amplification, dans les mêmes conditions que ci-dessus, à partir de 1 μ l de la solution obtenue après dilution d'une petite partie du produit obtenu après la première PCR au 1/10, afin d'enrichir l'échantillon en fragment recherché, avant le clonage. L'ensemble des fragments obtenus sont traités à la Klenow polymérase pour rendre les bouts francs (Maniatis et al., 10 *Molecular Cloning*, 2ème édition, pages 5.40 à 5.43).

Le fragment de 643 pb a été purifié et sous-cloné dans un vecteur plasmidique (Bluescript[®] ; sous-clones R2, R5, R10, R11) et M13 tg 130 et tg 131 pour la séquence.

15 En se basant sur cette séquence, une amorce spécifique du récepteur β 3-adrénergique canin a été synthétisée et se situe en position 464 par rapport au codon d'initiation ATG (RT1, SEQ ID NO:3) ; elle est employée comme amorce sens pour cloner un 2ème fragment du gène β 3-adrénergique canin. Comme amorce anti-sens, une amorce humaine (TR2, SEQ ID NO:47) ou, autrement dit "inter-espèce", a été choisie car la comparaison des séquences β 3-adrénergiques montre une grande similitude dans cette région.

25 La réaction PCR a été faite comme suit :

A 700 ng d'ADN génomique canin, on ajoute les amorces RT1 et TR2 à une concentration de 0,25 μ M chacune, 10 % diméthylsulfoxyde, 2,5 U de Taq polymérase (Promega), 0,25 mM de dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), le 30 tampon de réaction utilisé est celui fourni par Promega complémenté par 1,5 mM de $MgCl_2$.

Un appareil LEP[®] Scientific, PREMTM est utilisé pour réaliser cette réaction. Après une étape de dénaturation initiale (5 min. à 92°C), on fait 30 cycles

comme suit: 1 min. à 92°C; 1 min. à 62°C; 1 min. 30 sec. à 72°C; et en dernier 1 fois 7 min. à 72°C.

Dans ces conditions, on obtient un fragment de 577 pb. Avant la ligation dans un vecteur, ce fragment est traité à la Klenow polymérase et ensuite isolé sur gel de polyacrylamide à 5%. Ce fragment a été sous-cloné dans le vecteur M 13 tg 130 (clonage à bouts francs dans le site EcoRV) dans les deux orientations (Clone 1 = sens, Clone 10 et 13 = anti-sens). Ce fragment correspond au gène β_3 -adrénergique canin allant de la région transmembranaire 4 à la région transmembranaire 7.

Le clonage par PCR permet d'obtenir la partie codante du gène allant de la méthionine en position 1 jusqu'à la cystéine en position 347.

Ces 1041 nucléotides comprennent la séquence codante pour les 7 domaines transmembranaires du récepteur.

Exemple 2 : Isolement et identification du gène β_3 -adrénergique canin.

- Etude moléculaire du gène RA- β_3 canin, construction d'une banque génomique :

Hybridation d'ADN génomique (Southern Blot) :

D'abord l'ADN génomique canin a été coupé par différentes enzymes de restriction, afin de connaître les sites de restriction qui encadrent le gène RA- β_3 canin :

1) Utilisation d'une seule enzyme : les enzymes utilisées sont : Xba I, Bam HI, Hind III et Eco RI (10 μ g d'ADN/coupeure).

2) Utilisation de deux enzymes, simultanément : les enzymes utilisées sont : Xba I/Hind III ; Xba I/Bam HI ; Bam HI/Hind III ; Eco RI/Xba I ; Eco RI/Hind III et Eco RI/Bam HI.

L'ADN coupé a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7% et ensuite dénaturé en présence de NaOH 0,05 M, NaCl 1,5 M, puis transféré sur une mem-

brane de Nylon (Hybond[®] N+ Amersham) en présence de NaCl 3 M ; Na-citrate 0,3 M (=Southern Blot).

Les sondes RA- β_3 canin ont été préparées par PCR en utilisant les conditions décrites plus haut, et ensuite radiomarquées au ^{32}P par la méthode du "random priming" utilisant le dCTP $\alpha^{32}\text{P}$ et le dATP $\alpha^{32}\text{P}$.

Les membranes ont été mise en présence des sondes RA- β_3 canin radiomarquées au phosphore 32 (=hybridation Southern) dans le milieu réactionnel suivant :

600 mM de NaCl ; 60 mM de Na-citrate ; Tris-HCl 8 mM pH 7,5 ; 50 mM de phosphate de sodium ; 1 % de Ficoll ; 1 % de polyvinylpyrrolidone ; 1 % de sérum albumine bovine ; 40 % de formamide ; 0,2 % de SDS ; 10 $\mu\text{g/ml}$ d'ADN de sperme de saumon.

Après une préhybridation dans ce milieu à 42°C pendant au moins une heure, les sondes radiomarquées sont ajoutées, à une concentration d'environ 10^6 cpm/ml de milieu d'hybridation.

L'hybridation est réalisée pendant une nuit (12-16 h) à 42°C.

Les membranes ont été lavées avec une solution contenant 3 mM de NaCl ; Na-citrate 0,3 mM ; SDS à 0,05 %, à 50°C pendant 30 min ou 1 heure pour les fragments obtenus avec les deux enzymes. Après traitement, les membranes sont mises en contact avec un film radiographique (autoradiographie) pendant 3 jours (4 jours pour les coupures par deux enzymes). La révélation de ce film fait apparaître des fragments de taille différente dans chaque piste correspondant à des enzymes différentes. Les figures 3A et 3B montrent les résultats obtenus à partir de deux Southern Blots, réalisés dans les conditions définies ci-dessus.

Sur la figure 3A, M = marqueur de tailles, X = XbaI (6,4 kb), B = Bam HI (8 kb), H = Hind III (≥ 20 kb), E = Eco RI (6 kb) ; sur la figure 3B, XH = Xba I-Hind III (6,4 kb), XB = Xba I-Bam HI (4,3 kb), BH = Bam HI-Hind III (6,3 kb), EX = Eco RI-Xba I (3,7 kb), EH = Eco RI-Hind III (4,8 kb), EB = Eco RI-Bam HI (6 Kb).

Ces données ont permis d'établir une carte de restriction du fragment génomique canin qui contient le gène RA- β_3 (figure 4). Ces expériences montrent que le gène RA- β_3 canin est contenu dans un fragment génomique de 3,7 kb encadré par les sites de restriction Eco RI et Xba I.

La présence d'une bande unique pour chaque coupure indique qu'il n'y a pas, dans le génome canin, d'autres séquences hautement homologues au gène β_3 -adrénergique.

Les gènes RA- β_3 des différentes espèces sont composés d'une région promotrice suivie d'une région codante d'environ 1,2 kb = exon 1, qui est le plus souvent interrompue par un intron d'environ 1 kb. L'exon 2 code en général pour 6 à 8 acides aminés et la séquence suivante correspond à la partie 3' non-traduite, ce qui permet de conclure que le gène β_3 proprement dit est contenu dans le fragment génomique EcoRI et Xba I de 3,7 kb, ou alors plus largement encadré par 2 sites EcoRI.

C'est le fragment d'ADN génomique EcoRI de 6 kb qui a été sélectionné et qui est utilisé pour construire la banque d'ADN génomique.

- La banque génomique a été construite dans un bactériophage lambda comme suit :

1) Digestion d'ADN génomique

2x 100 μ g d'ADN génomique canin ont été digérés par EcoRI (New England Biolabs) dans les conditions suivantes :

1,25 U d'enzyme/ μ g d'ADN, 10 mM de spermidine, tampon de réaction fournie par le fabricant ; incubation une nuit à 37°C.

Ensuite les fragments issus des coupures ont été déposés sur un gel d'électrophorèse d'agarose à 0,7%. La migration a été effectuée à 20 V pendant 24 heures.

Pour enrichir la banque en fragments EcoRI contenant le gène recherché, trois fractions ont été découpées par dépôt et ceci par rapport au marqueur indiquant les tailles de référence, c'est-à-dire allant de

- 1) 8 à 7 Kb,
- 2) 7,2 à 6 Kb,
- 3) 6,3 à 4,8 Kb

Le marqueur de taille utilisé est "Lambda DNA Bst EII digest" (New England Biolabs réf. 301-4S).

Ces six morceaux ont été traités séparément par Spin-XTM (Costar 0,22 μ M cellulose acétate) afin d'en extraire l'ADN. Après précipitation à l'éthanol, les culots d'ADN ont été solubilisés dans 60 μ l de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5, 1 mM EDTA (TE).

2 μ l de chaque fraction ont été déposés sur gel d'agarose. Le résultat est illustré à la figure 5, dans laquelle A et B correspondent à 2 digestions d'ADN génomique par EcoRI et les pistes 1, 2, 3 correspondent respectivement aux poids moléculaires suivants : 1 : 8 à 7 kb, 2 : 7,2 à 6 kb, 3 : 6,3 à 4,8 kb.

De plus, une hybridation Southern a été effectuée pour connaître la fraction à liguer qui contient effectivement le gène RA- β 3 canin. Pour ce faire, on fait migrer environ 750 ng de chaque fraction sur gel d'agarose.

Après électrophorèse et dénaturation, l'ADN a été transféré sur membrane Nylon (Hybond N+ voir conditions Southern Blot telles qu'exposées ci-dessus). On utilise les mêmes sondes de β 3 canin, le marquage ayant été fait par "random priming" utilisant uniquement le

dCTP $\alpha^{32}\text{P}$. Les conditions d'hybridation et de lavage sont les mêmes que précédemment.

Après exposition pendant 2 jours, on obtient les résultats illustrés à la figure 6 ; le gène codant pur le RA- β 3 canin est majoritairement contenu dans la fraction 2 :

les deux fractions n°2 venant des deux digestions (voir figure 6, dans laquelle 1, 2 et 3 ont la même signification que pour la figure 5) sont mélangées, afin de les liguer dans un vecteur bactériophagique.

2) Ligation dans un vecteur bactériophagique et encapsidation in vitro :

Comme vecteur, on utilise le bactériophage Lambda λ GEM-2 (Promega), déjà coupé par EcoRI et déphosphorylé pour éviter qu'il ne se referme sur lui-même.

Le vecteur a été ligué avec des quantités croissantes de fragments EcoRI génomiques de la fraction 2 (voir figure 6) (Insert) : 1 μg V + 50ng I; 1 μg V + 100 ng I, 1 μg V + 150 ng I; puis 0,75 μg V + 200 ng I (V= λ GEM-2, I=Insert).

Ligation à 4°C.

Après ligation, les particules des phages ont été encapsidées à l'aide d'extraits d'encapsidation in vitro Promega "Packagene^R System" pendant 3 heures à 22°C.

Après cette incubation, les particules des phages ainsi reconstituées sont en mesure d'infecter des bactéries d'une souche appropriée. Il s'agit de la souche LE 392 (Genotype: F⁻, hsdR 574 (r_K⁻, m_K⁺), supE44, supF58, LacY1 ou $\Delta(\text{lacIZY})6$, galK2, GalT22, metB1, trpR55).

Une colonie de ces bactéries a été mise en culture pour obtenir des cellules fraîches à infecter par les phages, le but étant de pouvoir étaler les bactéries infectées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu

nutritif, afin de pouvoir cribler avec une sonde radio-marquée. Pour ce faire, on dilue très fortement les phages encapsidés avant de les mettre en contact avec les cellules bactériennes afin de pouvoir les étaler à une densité voulue, c'est-à-dire de pouvoir déterminer les titres de la banque (= nombre des phages recombinants obtenus).

Ainsi, on a pu déterminer que la banque ainsi construite comporte environ 377 000 phages.

10 **3) Criblage de la banque :**

Toute la banque a été étalée sur différentes boîtes de Pétri à l'aide des bactéries hôtes LE 392 et ensuite des empreintes sur membranes de nylon Hybond N+ (Amersham) ont été prises.

15 La sonde a été faite par PCR sur ADN génomique canin avec les amorces SEQ ID NO:26 (1269) et SEQ ID NO:47 (TR2).

2 Les conditions de PCR ont été les suivantes :
 amorces à une concentration de 0,25 μ M ;
20 tampon comprenant diméthylsulfoxyde à 10 %, 2,5 U de Taq polymérase (Promega), 0,25 mM de dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), le tampon de réaction utilisé est celui fourni par Promega, complété avec 1.5 mM de $MgCl_2$.

 On utilise un appareil Perkin Elmer "Gene Amp
25 PCR System 9600".

 Après une étape de dénaturation initiale (2 min. à 94°C), on fait 30 cycles comme suit : 15 sec. à 94°C, 30 sec. à 63,6°C, 60 sec. à 72°C et en dernier 1 fois 3 min. à 72°C.

30 Le fragment PCR de 1041 nucléotides ("ATG" - TM7) a été isolé à partir d'un gel d'agarose et ensuite purifié par Spin - XTM (Costar 0,22 μ M cellulose acétate).

 Le radiomarquage a été fait par random
35 priming, comme précisé ci-dessus, en utilisant du dCTP α ³²P (Amersham réf. PB 10205).

Les conditions d'hybridation sont les mêmes que celles décrites plus haut (*Southern Blot*).

Les membranes ont été lavées avec une solution comprenant 3 mM de NaCl, 0,3 mM de Na-citrate, 0,05 % de SDS, à 45°C pendant 30 min.

Après une exposition durant 4 jours, 7 signaux fortement positifs et 50 signaux faiblement positifs ont été trouvés ; seuls les signaux fortement positifs ont été pris en compte.

Après différentes étapes de purification, c'est le clone $\lambda 20,1$ qui a été sélectionné pour des analyses plus poussées.

4) Analyse du clone $\lambda 20,1$:

L'ADN du phage $\lambda 20,1$ a été préparé et ensuite coupé par EcoRI (= site d'insertion) et par EcoRI-XbaI (= sites uniques sur le vecteur).

Les tailles trouvées sont les suivantes : EcoRI 6 Kb/EcoRI-XbaI 3,7 Kb et >2,3 Kb.

Ces résultats sont en accord avec les tailles trouvées par *Southern Blot* sur ADN génomique canin (voir carte de restriction plus haut).

5) Sous-clonage dans un vecteur M13 pour le séquençage :

Le fragment EcoRI du clone $\lambda 20,1$ a été sous-cloné dans le vecteur M13 tg131 ; les sous-clones 20,1,9 et 20,1,4 sont des clones « anti-sens » dans ce vecteur et ceci par rapport à l'emplacement du primer universel M13. L'insert du clone 20,1,4 aussi appelé 4AS a été séquencé [voir plus loin 6)].

Pour avoir l'orientation opposée, un sous-clonage a également été réalisé à partir du clone 20,1,4 (4AS). Sachant que la partie intéressante de l'insert EcoRI provenant de l'ADN génomique se situe plus précisément entre les sites EcoRI et XbaI sur un fragment de 3,7 Kb, ce fragment a été sous-cloné dans un vecteur M13 tg 130 dans ces mêmes sites. Plusieurs sous-clones ont

été obtenus : EX 3, EX 4, Ex 5, Ex 6. Le clone EX 4 aussi appelé 4S a été sélectionné pour une analyse de séquence.

Le gène a été séquencé sur les 2 brins (Sous-clones 4S et 4AS) à l'aide d'amorces spécifiquement synthétisées.

Les amorces utilisées sur le brin anti-sens (4AS) sont, dans l'ordre séquentiel, les suivantes : primer universel M13 (-40) : SEQ ID NO:5 (TR 12), SEQ ID NO:6 (TR 15), SEQ ID NO: 7 (TR 24), SEQ ID NO:4 (TR 22),
10 SEQ ID NO:8 (TR 21), SEQ ID NO:13 (TR25), SEQ ID NO:9 (1263), SEQ ID NO:10 (TR 7), SEQ ID NO:11 (TR 8), SEQ ID NO:12 (TR 10).

Les amorces utilisées sur le brin sens (4S), dans l'ordre séquentiel, sont les suivantes : SEQ ID
15 NO:14 (SG 2), SEQ ID NO:15 (RT 3), SEQ ID NO:3 (RT 1), SEQ ID NO:16 (RT 5), SEQ ID NO:17 (RT 6), SEQ ID NO:18 (RT 9), SEQ ID NO:20 (RT 17), SEQ ID NO:22 (RT 16), SEQ ID NO:19 (RT 26), SEQ ID NO:21 (RT 27) et SEQ ID NO:23 (RT28).

20 6) Résultats de séquence :

L'insert EcoRI-XbaI n'a pas été séquencé en totalité mais juste la partie correspondant aux séquences suivantes : la séquence en 5'=112 nucléotides avant le codon d'initiation "ATG", la phase ouverte de lecture
25 (exons 1 et 2), l'intron, ainsi que la séquence en 3' allant jusqu'au site EcoRI (=en tout 2649 pb).

Les résultats obtenus, montrent la séquence nucléotidique du gène β 3-adrénergique canin composée d'une région codant pour la protéine (1196 pb dans l'exon
30 1 plus 22 pb dans l'exon 2), et des régions non codantes (112 pb en 5' et 616 pb en 3'), ainsi que l'intron de 703 pb qui sépare les 2 exons.

Les sites de restriction uniques contenus dans le fragment de 2649 pb sont positionnés sur les figures 7
35 et 8.

La comparaison des régions codantes des gènes β 3-adrénergique canin et humain indique une forte homologie (82%) (figure 9) ; toutefois, les différences observées, tant structurelles que pharmacologiques, mettent en valeur l'importance de l'isolement du récepteur β 3-adrénergique canin.

La séquence β 3-adrénergique canine code pour une protéine de 405 acides aminés et porte les caractéristiques structurales des récepteurs β 3-adrénergiques, notamment les sept régions hydrophobes qui correspondent probablement à des segments transmembranaires. Dans la partie extracellulaire (e1) on trouve deux sites de glycosylation (NGS et NTS) communs aux autres récepteurs β 3-adrénergiques.

Ainsi l'exon 1 code pour la majorité de la phase ouverte allant du codon d'initiation "ATG" en position 1, à la séquence GAC GG/ en position 1196 ; la séquence intronique comporte 703 pb.

L'épissage se fait comme suit :

pos.1189' CTC GAC GG/g t g g g t

Leu Asp Gly

ttttt c a g/G GCT TCC TGG GGA ATC TCT TAG

Ala Ser Trp Gly Ile Ser (Stop)

par rapport au codon d'initiation « ATG »

L'exon 2 code pour les 6 acides aminés ci-dessus.

Les signaux d'épissage sont soulignés / gt.....ag/ (voir aussi Maniatis vol. 3 page 16.7 et van Spronsen, Eur. J. Biochem. 213, 1117 - 1124 (1993)).

7) Sous-clonage dans un vecteur pour expression dans des cellules eucaryotes :

Le vecteur pcDNA 3 (Invitrogene) peut transformer les cellules eucaryotes en culture de manière

stable et transitoire et exprimer les gènes clonés, sous dépendance du promoteur CMV (Cytomegalovirus).

La séquence β 3-adrénergique canine montre un site BspE I à 54 bases avant le codon ATG. Le sous-clonage a été fait en prenant les sites BspE I en 5' et EcoRI en 3' du gène.

Le fragment de 2590 pb a été ligué dans le vecteur pcDNA 3 comme suit :

1) - En pratique, l'ADN du clone 4S a été coupé par BspE I (New England Biolabs). Le protocole comprend ensuite :

- extraction phénol/chloroforme pour inactiver l'enzyme,
- traitement à la Klenow polymérase (New England Biolabs) d'après Maniatis,
- extraction phénol/chloroforme pour inactiver l'enzyme,
- coupure par EcoRI (New England Biolabs) et inactivation de l'enzyme 15 min. à 65°C et
- dépôt de la totalité sur gel d'agarose et purification du fragment de 2,5 kb par Spin-X.

2) - Ligation de ce fragment dans le vecteur qui a été préparé comme suit:

Coupure par Bam HI (New England Biolabs) ; inactivation de l'enzyme 15 min. à 65°C ; traitement à la Klenow polymérase (New England Biolabs) d'après Maniatis ; extraction phénol/chloroforme pour inactiver l'enzyme et coupure par EcoRI (New England Biolabs) ; inactivation de l'enzyme 15 min. à 65°C.

On obtient ainsi plusieurs sous-clones, le n° 8 a été séquencé pour vérifier le codon d'initiation "ATG" afin d'être sûr qu'il n'y a pas d'empêchement de la traduction du messenger en protéine après transformation dans les cellules.

Exemple 3 : Propriétés pharmacologiques du produit d'expression du gène $\beta 3$ canin.

A. MATERIELS ET METHODES

I. Techniques de transfection

a) Transfection stable de cellules CHO-K1 :

Le plasmide pcDNA3 contenant le gène du récepteur $\beta 3$ adrénergique canin a été transfecté dans des cellules CHO-K1 par une méthode de transfection à la lipofectine (Gibco) ; les cellules transfectées sont sélectionnées avec de la généticine (G418).

Méthode de transfection

Les cellules CHO-K1 sont cultivées à confluence dans un milieu de culture contenant: 50 % de milieu DMEM, 50 % de milieu Ham's F12, 10 % de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur et de la glutamine 2 mM.

1 μ g d'ADN du plasmide pcDNA3 $\beta 3$ canin est mélangé à 5 μ l de lipofectine (GIBCO) et 1 ml du milieu de culture décrit, sans sérum. Ce mélange est ajouté aux cellules en culture, qui sont incubées 5 heures à 37°C. Le milieu est remplacé alors par le milieu de culture précité contenant du sérum et les cellules sont à nouveau incubées 48 heures.

Les cellules sont alors diluées et réparties dans des plaques de 96 puits et incubées en pression de sélection c'est-à-dire dans le milieu de culture précité contenant de la généticine (G418 GIBCO) 400 μ g/ml pendant environ 20 jours, le milieu étant changé tous les deux jours.

Les clones obtenus sont ensuite sous-clonés et les sous-clones obtenus sont criblés pour leur capacité à lier de façon spécifique 1' [125 I]-cyanopindolol (ICYP) ainsi que leur capacité à stimuler l'adénylyl cyclase.

b) Transfection transitoire de cellules COS-1:
Méthode de transfection

Les cellules COS-1 sont cultivées à confluence dans un milieu de culture contenant: 90% de milieu DMEM, 5 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur, de la glutamine 2 mM et de l'HEPES 10 mM. 48 heures avant la transfection les cellules sont lavées, décollées avec de la trypsine et ensemencées à $1,7 \cdot 10^4$ cellules/cm² en plaques de 6 puits.

10 Le jour de la transfection, les cellules COS-1 sont lavées 2 fois en tampon PBS, chaque puits est incubé avec 1 ml de milieu DMEM de transfection contenant 1 µg de pcDNA3/rβ3 (miniprep) et 20 µl de DEAE-Dextran (10 mg/ml) préalablement mélangés et 8 µl de chloroquine 15 10 mM, pendant 4 à 6 heures à 37°C. Le milieu de transfection est aspiré et les cellules sont incubées avec 10 % de DMSO dans le milieu DMEM pendant exactement 90 secondes. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS et 3 ml de milieu DMEM contenant 10 % de sérum sont ajoutés 20 dans tous les puits. La préparation membranaire pour les essais de liaison et l'accumulation d'AMPC sur cellules entières sont réalisés 48 à 72 heures après la transfection.

c) Transfection stable de cellules HEK293 :

25 Le plasmide pcDNA3/rβ3 adrénérigique canin a été transfecté dans des cellules HEK293 par une méthode de transfection à la lipofectine (Gibco) comme décrit en a) ; les cellules transfectées sont sélectionnées avec de la généticine (G418) 500 µg/ml.

30 On utilise la même technique que celle décrite pour les cellules CHO-K1, à l'exception de différences mineures concernant la durée de deuxième incubation des 35 cellules, après ajout du mélange plasmide et lipofectine (incubation de 24 heures) et la concentration en généticine.

II. Préparation de membranes de cellules COS-1 après transfection

L'activité de l'adénylyl cyclase et les essais de liaison sont réalisés sur des préparations membranaires de cellules COS-1 transfectées de façon transitoire comme expliqué ci-dessus.

Le milieu de culture des cellules est enlevé, les cellules sont lavées avec du PBS et incubées avec 1 ml/puits dans un tampon de lyse (choc hypotonique) contenant Tris/HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM et les inhibiteurs de protéases PMSF (0,5 mM) et leupeptine (5 µg/ml) pendant 10 minutes à 4°C, puis homogénéisées, transférées dans des tubes pour centrifugation et incubées de nouveau 15 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées 60 minutes, à 4°C, 20 000 rpm (50 000 g) rotor JA20. Les culots membranaires sont repris dans le tampon de stockage (Tris/HCl 25 mM pH 7,4, 1 mM d'EDTA, 10 % de glycérol et les inhibiteurs de protéases) et stockés à -80°C.

III. Mesure de la production d'AMPC

* dans les cellules CHO-K1

Les cellules préconfluentes ($0,5 \times 10^6$ cellules/puits) sont lavées avec du milieu Ham's F12 pH 7,4 contenant de la 3-isobutyl-méthylxanthine (IBMX, Sigma) 1 mM et de l'HEPES 20 mM. Les cellules sont incubées 25 min. à 37°C dans 1 ml de milieu, en l'absence (niveau basal) ou en présence de 100 µM d'(-)-isoprotérénol (effet maximum), ou de 100 µM de forskoline (stimulation directe de l'adénylyl cyclase), ou 10 µM de ligand. L'activité antagoniste est testée, en pré-incubant les cellules avec 10 µM de ligand 10 min. avant l'ajout de l'(-)-isoprotérénol à une concentration sous-maximale de 10^{-8} M. La réaction est arrêtée par un lavage avec 1 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline) et l'addition de 500 µl de soude 1 N. Après 20 min. à 37°C. Les cellules décollées et lysées sont reprises, ajoutées à de l'acide

acétique 1 N, pH 7,4 et centrifugées à 3 000 x g, 4°C, 10 minutes. Le taux d'AMPC total contenu dans 50 µl de surnageant est déterminé en utilisant le kit de dosage Amersham (Kit 3H-cAMP Amersham ref. TRK 432). Les expériences ont toutes été réalisées 2 ou 3 fois en duplicats.

* dans les cellules HEK293 :

On utilise la même technique que celle décrite pour les cellules CHO-K1, ci-dessus, sauf que la réaction est arrêtée par centrifugation (3 000 x g, 10 min, 4°C) du milieu d'incubation contenant les cellules et non par lavage ; le surnageant contenant le ligand est éliminé et 500 µl de soude sont ajoutés sur le culot cellulaire. Après 20 minutes à 37°C, les cellules lysées sont ajoutées à de l'acide acétique 1 N, pH 7,4 et centrifugées à 3 000 x g, 4°C, 10 minutes.

IV. Mesure de la liaison

a) Méthode de liaison sur les clones stables CHO-K1 β3 canin

Les études de liaison sur les cellules CHO-K1 β3 canin ont été menées suivant le protocole décrit dans Tate et al., Eur. J. Biochem., 1991, 196, 357-361.

b) Liaison sur préparation membranaire

Les mesures de liaison ont été menées sur des préparations membranaires réalisées à partir des cellules COS-1 transfectées pendant 72 heures.

Les aliquots membranaires, 10-15 µg de protéines par point, sont incubés dans un tampon contenant une solution saline Hank's (réf.: 010328 catalogue Eurobio), de l'HEPES 20 mM et 0,1 % de BSA (bovine serum albumin), avec 1 nM d'ICYP (2 000 Ci/mmol) en présence ou en l'absence de concentrations croissantes de compétiteur (1 pM-100 µM) ; l'inhibition de l'ICYP par le (-)-bupranolol 10^{-4} M permet d'estimer la liaison non spécifique.

Les courbes de saturation ont été réalisées en présence de concentrations croissantes d'ICYP (1 pM à 4 nM) en présence de (-)-bupranolol 10^{-4} M (liaison non spécifique).

- 5 Les tubes sont incubés 30 minutes à 37°C sous agitation. L'arrêt de la réaction se fait par filtration des aliquots sur filtre en fibres de verre saturé préalablement avec 0,3 % de polyéthylèneimine, suivi par 3 lavages avec 3 ml de tampon PBS (phosphate buffered
10 saline) glacé. La radioactivité retenue sur le filtre est mesurée dans un compteur gamma (CompuGamma LKB 1282).

B. RESULTATS

Expression stable du récepteur $\beta 3$ canin dans les cellules CHO-K1.

- 15 * Sélection des clones stables exprimant le récepteur $\beta 3$ canin :

- 2 Le plasmide pcDNA3/r $\beta 3$ adrénergique canin a été transfecté dans des cellules CHO-K1 comme décrit à l'exemple 3. Après 3 semaines, 30 clones résistants à la
20 généticine ont été sélectionnés.

- Ces clones ont été testés pour leur capacité à lier le radioligand ICYP suivant le protocole décrit à l'exemple 3. Ce test permet d'évaluer le niveau d'expression des récepteurs à la membrane des cellules.
25 Sept clones ont été ainsi sélectionnés pour leur bon niveau d'expression des récepteurs à la membrane plasmique (le rapport de la liaison spécifique sur la liaison non spécifique était au moins supérieur à 5).

* Mesure de l'accumulation d'AMPC :

- 30 Deux clones ont été choisis pour la poursuite des études de fonctionnalité par la mesure de l'activité de l'adénylyl cyclase. La figure 10 présente une expérience typique réalisée avec l'un des deux clones stables exprimant le récepteur $\beta 3$ canin (CHO-K1 $\beta 3$ canin).

L'accumulation d'AMPC a été mesurée simultanément sur ce clone et sur un clone stable CHO-K1 exprimant le récepteur $\beta 3$ humain comme contrôle positif (CHO-K1 $\beta 3$ humain).

5 L'(-)-isoprotérénol a été utilisé à la concentration de 10^{-6} M (iso-4) et deux ligands spécifiques du récepteur $\beta 3$ -adrénergique humain, le CGP12177A et le CL316,243 à la concentration de 10^{-6} M. Cette expérience a été réalisée au moins deux fois en duplicats avec deux
10 différents clones.

Les résultats (figure 10) montrent que dans ce type cellulaire, à savoir les cellules CHO-K1, lorsque le récepteur $\beta 3$ canin est exprimé à la membrane des cellules, il est peu ou pas couplé à l'effecteur adénylyl
15 cyclase.

Expression transitoire et activité du récepteur $\beta 3$ canin dans les cellules COS-1.

* Mesure de l'accumulation d'AMPC dans les cellules COS-1 exprimant le récepteur $\beta 3$ canin.

20 Les courbes dose-réponse ont permis de déterminer les valeurs des constantes d'activation (K_{act}) et les activités intrinsèques (IA, prenant comme référence l'activité maximale de l'(-)-isoprotérénol 10^{-6} M), pour chaque ligand testé : (-)-norépinéphrine, (-)-épinéphrine, (-)-isoprotérénol, CGP 12177A et CL 316,243.
25

Ligands	K_{act} (nM)	IA
(-)-isoprotérénol	83±16	1,1±0,1
(-)-épinéphrine	1 560±940	0,71±0,09
(-)-norépinéphrine	238±210	0,70±0,30
CGP 12177A	38±18	0,55±0,11
CL 316,243	13±4	0,71±0,14
(-)-bupranolol	antagoniste	-

L'ordre de potentialité des catécholamines physiologiques : la (-)-norépinéphrine, l'(-)-épiné-

phrine, et synthétique : l'(-)-isoprotérénol, défini pour le récepteur β_3 canin est similaire à celui déjà décrit pour les récepteurs β_3 humain, de rongeurs et bovin (BLIN N. et al., Br. J. Pharmacol., 1994, 112, 911-919 ;
 5 PIETRI-ROUXEL F. et al., Eur. J. Biochem., 1995, 230, 350-358). Les agonistes spécifiques du sous-type β_3 adrénergique comme le CGP 12177A et le CL 316,243 sont également décrits ici comme étant des agonistes du récepteur RA- β_3 canin. Le bupranolol possède une activité antago-
 10 niste sur le récepteur β_3 canin, comme précédemment décrit pour les récepteurs β_3 humains et murins, alors qu'il est agoniste partiel sur le récepteur β_3 bovin.

* Mesure de la liaison sur préparations membranaires de cellules COS-1 exprimant le récepteur β_3
 15 canin :

Les courbes de saturation ont permis de déterminer la valeur de la constante de dissociation du radio-ligand ICYP pour le récepteur β_3 canin, K_D de $4,75 \pm 3,13$ nM.

20 Les courbes de compétition ont été réalisées sur les mêmes préparations membranaires avec les ligands : (-)-norépinéphrine, (-)-épinéphrine, (-)-isoprotérénol, CGP 12177A et CL 316,243, pour lesquels les constantes d'inhibition (K_i) ont été déterminées.

25

Ligands	K_i (nM)
(-)-isoprotérénol	10 700 \pm 4 100
(-)-épinéphrine	133 000 \pm 121 000
(-)-norépinéphrine	60 000 \pm 800
CGP 12177A	279 \pm 137
CL 316,243	640 \pm 320
bupranolol	242 \pm 45
ICYP	$K_D = 4,75 \pm 3,13$ nM

L'ordre d'affinité des catécholamines (-)-norépinéphrine, (-)-épinéphrine et (-)-isoprotérénol

correspond au profil décrit pour les récepteurs $\beta 3$ adrénergiques humain, bovin et de rongeurs.

* Expression stable du récepteur $\beta 3$ canin dans les cellules HEK293.

5 . Sélection des clones stables exprimant le récepteur $\beta 3$ canin :

Ces clones ont été testés pour leur capacité à lier le radioligand ICYP suivant le protocole décrit en IV a) (méthode de liaison sur les clones stables...).

10 Ce test permet d'évaluer le niveau d'expression des récepteurs, à la membrane des cellules. Deux clones ont été ainsi sélectionnés pour leur bonne expression à la membrane plasmique (le rapport de la liaison totale sur la liaison non spécifique était au
15 moins supérieur à 8).

 . Mesure de l'accumulation d'AMPC :

2 Ces deux clones ont été choisis pour la poursuite des études de fonctionnalité par la mesure de l'activité de l'adénylyl cyclase.

20 La figure 11 présente une expérience typique réalisée avec l'un des deux clones stables exprimant le récepteur $\beta 3$ canin. L'accumulation d'AMPC a été mesurée simultanément sur ce clone et sur un clone stable HEK293 exprimant le récepteur $\beta 3$ humain comme contrôle positif.
25 Les catécholamines physiologiques, la norépinéphrine (NE) et l'épinéphrine (EPI), un agoniste non spécifique l'(-)-isoprotérénol (ISO) et deux ligands spécifiques du récepteur $\beta 3$ adrénergique humain le carazolol (cara) et le CL316,243 ont été utilisés. Tous les ligands ont été uti-
30 lisés à la concentration de 10^{-6} M. Cette expérience a été réalisée au moins deux fois en duplicats avec deux clones différents. Les résultats montrent que dans ce type cellulaire, à savoir les cellules HEK293, lorsque le récepteur $\beta 3$ canin est exprimé à la membrane des cellu-
35 les, il est couplé à l'effecteur adénylyl cyclase.

Exemple 4 : Isolement et identification du gène β 2-adrénergique canin.

1) Préparation d'ARN :

Le gène β 2-adrénergique canin a été isolé à
5 partir d'une banque d'ADNc de tissu adipeux brun de
chiots nouveaux-nés, construite dans le bactériophage λ
gt 11.

Pour ce faire, les ARN totaux ont été obtenus
à partir de tissu adipeux brun de chiots par la méthode
10 utilisant le thiocyanate de guanidium. Ensuite, les ARN
messagers poly A+ ont été purifiés à l'aide de colonnes
oligo(dT) (Pharmacia réf. 27-9258-A).

2) Synthèse d'ADNc :

L'étape suivante a consisté à synthétiser
15 l'ADNc en prenant comme matrice les ARN messagers poly A+
purifiés, et comme amorce pour la synthèse du premier
brin un primer oligo(dT)₁₅ provenant du kit "RiboClone
cDNA synthesis system" (Promega réf. C2100). La synthèse
du premier brin d'ADNc se fait à l'aide d'une enzyme
20 (l'AMV reverse transcriptase), suivie par la synthèse du
deuxième brin à l'aide de deux enzymes agissant en même
temps (E. coli polymérase I et RNase H). Ensuite l'ADNc
double brin est traité par la T4 DNA polymérase, afin
d'obtenir des bouts francs. Le kit Promega C2100 a été
25 utilisé pour toutes ces réactions successives.

Une fois l'ADNc synthétisé, des adaptateurs
comportant des sites EcoRI ont été ajoutés, afin de pou-
voir l'insérer dans le bactériophage λ gt 11. Pour ce
faire, le kit "EcoRI Adaptor Ligation System I" (Promega
30 réf. C1900) a été utilisé. D'abord l'ADNc a été centri-
fugé à travers une matrice Sephacryl® S-400 (kit), pour
enlever les molécules de petite taille, ensuite les adap-
tateurs ont été ajoutés aux molécules d'ADNc par ligation
(T4 DNA Ligase du kit) durant la nuit et une nouvelle
35 centrifugation à travers une colonne Sephacryl® S-400 a

permis d'éliminer les adaptateurs non fixés. Avant de pouvoir insérer l'ADNc ainsi traité dans le vecteur λ gt 11, il faut phosphoryler ses adaptateurs à l'aide de l'enzyme T4 polynucléotide kinase, contenue dans le kit.

5 **3) Sélection de molécules d'ADNc de grande taille :**

Avant de liguer les molécules d'ADNc dans le vecteur λ gt 11, on sélectionne les fractions comprises entre 1,3 et 2,3 kilobases (kb). Cette étape sélective
10 est considérée comme un enrichissement, mais ce n'est pas réellement une purification, autrement dit les molécules d'ADNc de tailles avoisinantes ne sont pas totalement exclues.

Pour ce faire, l'ADNc est déposé sur un gradient d'acétate de potassium (5 à 20%) et ensuite centrifugé à 50 000 rpm (correspond à 170 000-304 000 g dans ce
15 rotor) pendant trois heures à 22°C dans un rotor SW 55 (Beckman). Ensuite, 27 fractions d'ADNc ont été prélevées. Après dépôt d'une petite quantité de chaque fraction sur un gel 0,8% agarose, nous avons sélectionné 4
20 fractions correspondant aux tailles voulues. Ces fractions ont été mélangées et ensuite liguées avec le vecteur λ gt 11.

4) Insertion (ligation) dans le bactériophage
25 **λ gt 11 :**

Le bactériophage λ gt 11, utilisé comme vecteur, provient du kit "Protoclone Lambda gt 11 System" (Promega réf. T 301/0-2). L'ADN du phage est digéré par EcoRI et déphosphorylé. La déphosphorylation empêche le
30 vecteur de se refermer sur lui-même.

Plusieurs ligations ont été faites avec des petites quantités variables d'ADNc, chacune liguée avec
0,5 μ g d'ADN de vecteur. Les ligations ont été faites pendant trois heures à température ambiante, en prenant
35 la T4 DNA Ligase du kit Promega C1900 (voir plus haut).

Tout de suite après, on procède à l'encapsidation *in vitro* à l'aide des extraits "Packagene" fournis par le kit Promega T301/0-2 (voir plus haut). Après une incubation à 22°C durant deux heures et demie, les particules des phages ainsi reconstituées sont en mesure d'infecter des bactéries d'une souche appropriée. Il s'agit de la souche Y 1090(r-) (Genotype: Δ (LacU169), proA+, Δ (lon); araD139, strA, SupF, (trpC22:Tn10 (tet^r), (pMC9), hsdR(r_K⁻, m_K⁺). Une colonie de ces bactéries a été mise en culture pour obtenir des cellules fraîches à infecter par les phages, le but étant de pouvoir étaler les bactéries infectées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif, afin de pouvoir cribler avec une sonde radiomarquée. Pour ce faire, on dilue très fortement les phages encapsidés, avant de les mettre en contact avec les cellules bactériennes, afin de pouvoir les étaler à une densité voulue, c'est-à-dire de pouvoir déterminer le titre de la banque (=nombre des phages recombinants obtenus).

Parallèlement, le vecteur seul a aussi été ligué et encapsidé afin de pouvoir connaître le bruit de fond de ce lot de λ gt 11.

Chaque dilution de phages a été incubée avec des cellules Y1090 (r-) à 37°C durant 30 minutes, et ensuite, ces bactéries infectées ont été étalées sur un milieu nutritif (LB agar) contenu dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C, et le lendemain on observe des plages de lyse, chaque plage correspond à un phage recombinant. En comptant le nombre de plages de lyse et en multipliant avec le facteur de dilution donné, on peut ainsi déterminer le titre de la banque, qui est d'environ 340 000 phages recombinants. (Le bruit de fond du vecteur seul sans insert est de 20 %).

5) Criblage des phages recombinants :

En se basant sur ces chiffres, environ 200 000 phages ont été étalés sur boîtes de Pétri (milieu LB agar) afin de pouvoir cribler avec une sonde radio-
5 marquée. Cette fois, c'est la souche bactérienne LE 392 (Genotype: F⁻, hdsR 574 (r_K⁻, m_K⁺) supE44, supF58, lacY1 ou Δ(lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55), qui a été utilisée.

Comme sonde radiomarquée, un fragment d'environ 600 paires de bases (pb) du gène β3-adrénergique
10 humain (L.J. Emorine et al., 1989, Science, 245, 1118-1121) a été utilisé. La sonde comprend la région codante allant du codon d'initiation (ATG) jusqu'au domaine transmembranaire 5 (TM 5).

15 Le radiomarquage de ce fragment a été fait par *Random Priming* (Kit Boehringer réf. 1004 760), en incorporant 50 μCi de dATP(α³²P) et de 50 μCi de dCTP(α³²P) (Amersham réf. PB 10204 et réf. PB 10205 respectivement).

D'abord, des empreintes d'ADN des plages de
20 lyse sur des membranes Hybond N+ (Amersham réf. RPN 132B) ont été prises. Ces membranes ont ensuite été hybridées avec la sonde en question, puis lavées et exposées pendant une nuit sur film d'autoradiographie.

24 signaux d'hybridation ont été observés,
25 dont 23 se sont par la suite révélés être de faux positifs. Le clone restant positif, appelé λD1, a été purifié par quatre isollements successifs, suivis d'une hybridation avec la sonde β3-adrénergique humaine.

6) Analyse du clone positif :

30 Pour identifier le clone contenant le gène β2-adrénergique canin en entier, c'est-à-dire l'ADNc correspondant à la région codante pour toute la protéine, l'ADN du phage λD1 a été préparé. Cet ADN a été coupé ensuite par l'enzyme de restriction *EcoRI* afin de vérifier la

taille de l'insert. Il y a en effet lieu de noter que deux fragments ont été obtenus : un de 2,4 kb et un de 0,25 kb, ce qui laisse supposer la présence d'un site *EcoRI* propre au gène β 2-adrénergique canin, car le site *EcoRI* est unique sur le vecteur λ gt 11.

7) Sous-clonage des fragments *EcoRI* dans un vecteur M13 :

Les fragments *EcoRI* du clone λ D1 ont été sous-cloné dans un bactériophage M13 (M13 tg 131) approprié pour faire le séquençage ; de cette manière, l'on obtient 4 sous-clones :

- un clone comportant l'insert de 2,4 kb du brin sens, appelé "H",
- un clone comportant l'insert de 2,4 kb du brin anti-sens, appelé "D3",
- un clone comportant l'insert de 0,25 kb du brin sens, appelé "16,4", et
- un clone comportant l'insert de 0,25 kb du brin anti-sens, appelé "16,2".

8) Séquençage du gène β 2-adrénergique canin :

Les 4 sous-clones ont été entièrement séquencés à l'aide du kit Sequenase version 2.0 (Amersham-United States Biochemical réf. 70770). La séquence a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques, qui s'hybrident sur le brin sens (H et 16,4) ou sur le brin anti-sens (D3 et 16,2). Ces amorces sont représentées par les séquences suivantes :

- amorces sens : SEQ ID NO:27→SEQ ID NO:36
- amorces sens : SEQ ID NO:37→SEQ ID NO:46.

Les résultats obtenus à partir de la séquence des fragments *EcoRI*, montrent la séquence nucléotidique du récepteur β 2-adrénergique canin (1248 pb) et des régions non-codantes (168 pb en 5' et 1262 pb en 3').

Les sites de restriction uniques contenus dans le fragment de 2679 pb sont positionnés sur les figures 12 et 13.

La comparaison des régions codantes des gènes β 2-adrénergique canin et humain et des rongeurs (hamster, rat, souris), indique une forte homologie (87%) (figure 14).

La séquence β 2-adrénergique canine code pour une protéine de 415 acides aminés SEQ ID NO:2 et porte les caractéristiques structurales des récepteurs β -adrénergiques, notamment les sept régions hydrophobes qui correspondent probablement à des segments transmembranaires. Dans la partie extracellulaire (e1) on trouve deux sites de glycosylation (NRS et NGS) communs aux autres récepteurs β 2-adrénergiques.

La partie C-terminale intracellulaire (i4) est plus conservée entre les récepteurs β 2-adrénergiques qu'entre les récepteurs β 3-adrénergiques. Toutefois, la séquence humaine révèle une absence de 6 résidus en position 360. Trois résidus sont absents dans la séquence β 2-adrénergique canin en position 391 comparée aux autres séquences β 2-adrénergiques. La figure 14 montre la comparaison en acides aminés des différents récepteurs β 2-adrénergiques.

9) Vérification de la présence du site *EcoRI* interne au gène :

Pour vérifier que les deux fragments *EcoRI* composent le gène β 2-adrénergique canin, une amplification PCR a été réalisée sur l'ADN du phage λ D1 avec des amorces s'hybridant de part et d'autre du site *EcoRI* (SEQ ID NO:35 et SEQ ID NO:37). Un fragment de 720 pb a ainsi pu être amplifié. Après sous-clonage dans le vecteur M13 tg 130 (clone n° 2) et séquençage de ce fragment, la cer-

titude que le site *EcoRI* se trouve en position 2427 sur la séquence a été apportée.

10) Préparation d'une sonde spécifique du gène β 2-adrénergique canin:

5 Le fragment *EcoRI* de 2427 pb du clone "H" a été purifié et utilisé comme sonde. Ce fragment d'ADN a été radiomarké, comme décrit plus haut, par la méthode du Random Priming. La sonde ainsi préparée a été utilisée dans des expériences d'hybridation d'ADN génomique
10 (Southern Blot), pour estimer sa spécificité vis-à-vis du gène β 2-adrénergique. L'ADN génomique canin a été coupé par les enzymes de restriction suivantes : *EcoRI*, *Hind III*, *Bam HI*, *Xba I*. Après séparation des fragments dans un champ électrophorétique sur gel d'agarose à 0,7 %,
15 l'ADN a été transféré sur une membrane de nylon (Amersham, Hybond N+). Cette membrane a été hybridée avec la sonde *EcoRI* puis lavée à faible stringence et ensuite autoradiographiée.

Les résultats indiquent, pour la coupure
20 *EcoRI*, un fragment de 8 à 8,5 kb, pour la coupure *BamHI* un fragment d'environ 20 kb, pour la coupure *XbaI* un fragment de 7,5 à 8 kb et pour la coupure *Hind III* un fragment de 4 kb. La présence d'une bande unique pour chaque coupure indique qu'il n'y a pas, dans le génome
25 canin, d'autres séquences hautement homologues au gène β 2-adrénergique.

Exemple 5 : Construction d'un vecteur pour l'expression du récepteur β 2-adrénergique canin.

La carte de restriction du gène β 2-adréner-
30 gique canin (figures 12 et 13) indique la présence d'un site de coupure par l'enzyme *Nae I*, en position 154, soit 15 pb en amont de la région codante du gène β 2-adrénergique canin. L'ADN du clone M13 - H a été digéré avec les enzymes *Nae I* et *EcoRI*, pour libérer le fragment
35 de 2273 pb contenant la région codante du gène β 2-

adrénergique canin et une partie de la région 3' non-traduite. Ce fragment d'ADN a été purifié, puis inséré dans le vecteur d'expression pcDNA 3 (Invitrogene), aux sites de coupure *Bam HI* et *EcoRI*. Comme les extrémités *Nae I* d'une part et *Bam HI* d'autre part, ne sont pas compatibles, les extrémités *Bam HI* du vecteur ont été traitées avec le fragment Klenow de la polymérase I, de façon à obtenir des bouts francs (Maniatis et al., Molecular Cloning, 2ème édition, pages 5.40 à 5.43). La coupure *Nae I* génère des bouts francs et après ligation, on a ainsi obtenu le plasmide recombinant pcDNA 3/r β 2-adrénergique canin (sous-clone 41). Le gène du récepteur β 2-adrénergique canin se trouve alors sous dépendance du promoteur fort CMV (cytomegalovirus), qui assure une sur-expression du gène une fois introduit dans les cellules de mammifères.

Exemple 6 : Etude de l'expression du récepteur β 2 canin dans les cellules CHO-K1.

*** Sélection des clones stables exprimant le récepteur β 2 canin :**

Le plasmide pcDNA3/r β 2 adrénérquique canin a été transfecté dans des cellules CHO-K1 comme décrit à l'exemple 3. Après 3 semaines environ, 39 clones résistants à la généticine ont été sélectionnés.

Ces clones ont été testés pour leur capacité à lier le radioligand ICYP, suivant le protocole décrit à l'exemple 3. Ce test permet d'évaluer le niveau d'expression des récepteurs à la membrane des cellules. Quatre clones ont été ainsi sélectionnés pour leur bon niveau d'expression des récepteurs à la membrane plasmique (le rapport de liaison spécifique sur la liaison non spécifique était au moins supérieur à 3). Le sous-clonage de ces clones a été entrepris afin de sélectionner une population homogène de cellules exprimant un taux élevé de récepteurs à la surface cellulaire. Sur ce critère,

les expériences d'accumulation d'AMPC ont été réalisées sur les sous-clones obtenus du clone 65.

* Mesure de l'accumulation d'AMPC :

10 sous-clones du clone 65 ont été choisis
5 pour la poursuite des études de fonctionnalité par la mesure de l'activité de l'adénylyl cyclase. L'accumulation d'AMPC a été mesurée sur ces sous-clones et sur un clone stable CHO exprimant le récepteur $\beta 2$ humain comme contrôle positif. L'(-)-isoprotérénol à la
10 concentration de 10^{-4} M (iso-4) a été utilisé. Cette expérience a été réalisée en duplicats sur les 10 sous-clones. La figure 15 présente une expérience typique réalisée avec 2 sous-clones exprimant le récepteur $\beta 2$ canin (CHO-K1 $\beta 2$ canin 10 et CHO-K1 $\beta 2$ canin 31). L'accumulation
15 d'AMPC a été mesurée simultanément sur ces deux sous-clones et sur un clone stable CHO exprimant le récepteur $\beta 2$ humain (CHO- $\beta 2$ humain) comme contrôle positif. Les résultats montrent que dans ce type cellulaire, à savoir les cellules CHO-K1, lorsque le récepteur $\beta 2$ canin est
20 exprimé à la membrane plasmique des cellules, il est peu ou pas couplé à l'effecteur adénylyl cyclase.

43

No de la demande internationale: PCT/

MICRO-ORGANISMES	
Feuille descriptive relative au micro-organisme mentionné au paragraphe 8, page 16 de la description	
A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT	
D'autres dépôts sont déposés sur une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/>	
Nom de l'institution du dépôt	
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays)	
28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15	
Date du dépôt	N° d'ordre
9 février 1996	I-1672
B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
<p>"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (règle 28.4) de la CBZ".</p>	
C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
CANADA ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE EUROPE	
D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (à ne remplir que si nécessaire)	
Les indications énumérées ci-dessous seront soumises ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., le No d'ordre du dépôt)	
<input type="checkbox"/> La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)	
(Fonctionnaire autorisé)	
<input type="checkbox"/> Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international	
(Fonctionnaire autorisé)	

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: VETIGEN
(B) RUE: 21 rue SEBASTIEN MERCIER
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75015

(A) NOM: LENZEN Gerlinde
(B) RUE: 55 RUE DES CEVENNES
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75015

(A) NOM: PIETRI-ROUXEL France
(B) RUE: 69 BOULEVARD BRUNE
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75014

(A) NOM: DRUMARE Marie-Francoise
(B) RUE: 87BIS BOULEVARD JEAN JAURES
(C) VILLE: FRESNES
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 94280

(A) NOM: STROSBERG ARTHUR DONNY
(B) RUE: 66 RUE DE JAVEL
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75015

(ii) TITRE DE L' INVENTION: SEQUENCES CODANT POUR LES RECEPTEURS BETA 2 ET BETA 3 ADRENERGIQUES CANINS ET LEURS APPLICATIONS EN TANT QUE SONDES ET POUR L'EXPRESSION DE PEPTIDES.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 47

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

(A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 96 03730
(B) DATE DE DEPOT: 26-MAR-1996

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 2679 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCACTCCGGG GCGGCTTCTC GGGGCGCAGG CTGTGGGGGC CGCGCGGGCG AGCGCAGAGC	60
ACCCCGCGAG CTGGATGCGG CTTCCCGGCG CCCGCTCGCT GCCCGCGGCG CCGCCCCCGA	120
GGTCCGCCCC CTGAGGCGCC CGTGCGCTCA CCTGCCGGCC CGCGCGCCAT GGGCCAGCCC	180
GCGAACCACA GCGTCTTCTT GCTGGCGCCC AACGGGAGCC ACGCGCCGA CCAGGGAGAC	240
TCGCAGGAGC GGAGCGAGGC GTGGGTGGTG GGCATGGGCA TCCTCATGTC GCTCATCGTC	300
CTGGCCATCG TGTTCCGGAA CGTGCTGGTC ATCACGGCCA TCGCCAGGTT CGAGCGTCTG	360
CAGACGGTCA CCAACTACTT CATCACCTCC CTGGCCTGTG CTGACCTGGT CATGGGCCTG	420
GCGGTGGTGC CCTTTGGGGC CAGCCACATC CTCATGAAAA TGTGGACCTT CGGCAACTTC	480
TGGTGTGAGT TTTGGACTTC CATTGACGTA TTGTGCGTCA CGGCCAGCAT CGAGACCCTG	540
TGCGTGATCG CGGTGGACCG CTACTTTGCC ATCACCTCGC CTTCAAGTA CCAGAGCCTG	600
CTGACCAAGA ATAAGGCCCC GGTGGTCATT CTGATGGTGT GGATCGTGTC CGGCCTCACC	660
TCCTTCTTGC CCATCCAGAT GCACTGGTAC CGGGCCACCC ACCAGGAAGC CATCAACTGC	720
TACGCCAAGG AGACGTGCTG TGACTTCTTC ACGAACCAAG CCTATGCCAT TGCCCTCCTCC	780
ATCGTGCTCT TCTACCTACC CTTGGTGGTC ATGGTCTTCG TCTACTCCAG GGTCTTCCAG	840
GTGCCCCAGA GGCAGCTCCA GAAGATCGAC AGATCGGAGG GCCGCTTCCA TGCCCCAAAC	900
CTCAGCCAAG TGGAGCAGGA TGGGCGGAGC GGGCACGGAC ATCGGAGGTC CTCCAAGTTC	960
TGCTTGAAGG AACACAAGGC CCTCAAACT CTGGGCATCA TCATGGGCAC TTTCACCCTG	1020
TGCTGGCTGC CCTTCTTCAT CGTCAACATA GTGCATGTGA TCCAGGATAA CCTCATCCCT	1080
AAGGAAGTTT ACATCCTCCT AAAGTGGGTG GGCTACGTCA ACTCTGCTTT CAATCCCCTT	1140
ATCTACTGCC GGAGCCCTGA CTTCAGGATT GCCTTCCAGG AGCTTCTGTG CCTGCGCAGG	1200
TCTTCCCTGA AGGCCTATGG GAATGGCTAC TCCAACAACA GTAACAGCAG AAGCGACTAT	1260
GCTGGGGAGC ACAGTGGATG TCACCTGGGG CAGGAGAAAG ACAGCGAACT GCTGTGTGAG	1320
GACCCCCCAG GCACGGAAGA CCGTCAAGGT ACTGTGCCTA GCGATAGCGT TGATTGCGAG	1380
GGGAGGAATT GTAGTACAAA CGACTCACTG CTGTAATGCA GCTTTTCTAC TTTTATAAC	1440
CCCCCTCCCC GCAACGAAAC ACTATACAGA CTATTTAACT TGAGTGTAAT AAATTTAGAA	1500
TAAAATTGTA TAGAGATGTG CAGGAGGAGG GACGGCCTTC TGCCTTTTTT TTTTATTTTT	1560
TTAAGCTGTA AAAAAAGAG AAAGCATATT CGAGTGATTG TTTGTTGTAC AGTTCAAGTTC	1620
CTTTTTTGCA TGAACCGTGT AAGTTTGTGT CTGAAGGGCT TTGGTCCCAG AGGACCTGGG	1680
GCTGCTATGT TTTGATGACT TTTCCGTGGG ATCTACCTCA TTTGATCAAG TATTAGGGGT	1740
AATATATATT GCTGCTGGTC ATCTGTATGT GAAGGAGTCT TTTCTTCCTG CACCCCTGCA	1800
CTGGAGGATC TTGAGTATCT CGGACCTTTC AGCTGTGAAC ACGGACTCTG CTGGCCCCCTC	1860
TTATTTGCTC AAACAGGGTG TTGTGTAGG CAGGGATTG AGGGGCAGCT TCAGTTGTGT	1920

TCCTGAGCAA AGTCTAAAGT TTACAGTAAA TAAATTGTTT GACCATGACT TCATTGCACC 1980
 TGTTTCTCCA AAACCCCTTG ACTGGAGTGT GGTCGCCTCC CCCCCTGGA AACCGCAGGG 2040
 CTTTGCTGCC TCTTCTCACA TTCTCCTCCT GCTCTGGGCC CCACACCCAG AGGTGCGGGC 2100
 AGCTTCTCCA GCCAGTCTTC ACCCTCCTGG TGGCCTCACA GGATCTTGA CTTGAAAGAG 2160
 CCCATAGAAA GCATTTGGCG TCCAAAGAGA CGAAAAATCT GTGAGGGGGA ATGACCTGCC 2220
 CAAGGTAAGA AGCCAAGGAT GTCAGAGACG GGGCTGCAGC CGTAGAACCC AGCTGTCAGC 2280
 TGTATTCTCT GGAACAGATG TCTTCCCTCC ACTGCATGGC CATTGACTTC TGTCTCGCC 2340
 CTCCATGGTG GCAGCTTTCT TTCCCTGGGG CTGTCACAGA ACAAACCTCAT GTCAGTGGGT 2400
 GTTACTGCTC TCAGGTCCTT AGCGCAGAAT TCAGGCAATG ACCAAATAAC CACAATAGGG 2460
 ATAAGAGAAA GAATTGTTCT TTTACTCAGC AAGAGTCTAC TAGGATATCC TCAGCGTTGG 2520
 GGAGGCGGGG GGACAGGGAG GAGCGGGGAA GAGATGCATG CTTCTCGAC CCACCAGGAA 2580
 TTATAAGCCA CTCCGGGTAG AAATTTCAG GAAAAAAA TGTAACTTT TCTGTCACCG 2640
 TTGTAAGTCC TGTGGACAAT AAACGTGATT AACAACAAC 2679

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 415 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Gly Gln Pro Ala Asn Arg Ser Val Phe Leu Leu Ala Pro Asn Gly
 1 5 10 15
 Ser His Ala Pro Asp Gln Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Glu Ala Trp
 20 25 30
 Val Val Gly Met Gly Ile Val Met Ser Leu Ile Val Leu Ala Ile Val
 35 40 45
 Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Arg Phe Glu Arg Leu
 50 55 60
 Gln Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Val Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ser His Ile Leu Met
 85 90 95
 Lys Met Trp Thr Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile
 100 105 110
 Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala
 115 120 125
 Val Asp Arg Tyr Phe Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys Tyr Gln Ser Leu
 130 135 140

47

Leu Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Val Ile Leu Met Val Trp Ile Val
 145 150 155 160
 Ser Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr Arg Ala
 165 170 175
 Thr His Gln Glu Ala Ile Asn Cys Tyr Ala Lys Glu Thr Cys Cys Asp
 180 185 190
 Phe Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe
 195 200 205
 Tyr Leu Pro Leu Val Val Met Val Phe Val Tyr Ser Arg Val Phe Gln
 210 215 220
 Val Ala Gln Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Arg Ser Glu Gly Arg Phe
 225 230 235 240
 His Ala Gln Asn Leu Ser Gln Val Glu Gln Asp Gly Arg Ser Gly His
 245 250 255
 Gly His Arg Arg Ser Ser Lys Phe Cys Leu Lys Glu His Lys Ala Leu
 260 265 270
 Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys Trp Leu Pro
 275 280 285
 Phe Phe Ile Val Asn Ile Val His Val Ile Gln Asp Asn Leu Ile Pro
 290 295 300
 Lys Glu Val Tyr Ile Leu Leu Asn Trp Val Gly Tyr Val Asn Ser Ala
 305 310 315 320
 Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ile Ala Phe
 325 330 335
 Gln Glu Leu Leu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Leu Lys Ala Tyr Gly Asn
 340 345 350
 Gly Tyr Ser Asn Asn Ser Asn Ser Arg Ser Asp Tyr Ala Gly Glu His
 355 360 365
 Ser Gly Cys His Leu Gly Gln Glu Lys Asp Ser Glu Leu Leu Cys Glu
 370 375 380
 Asp Pro Pro Gly Thr Glu Asp Arg Gln Gly Thr Val Pro Ser Asp Ser
 385 390 395 400
 Val Asp Ser Gln Gly Arg Asn Cys Ser Thr Asn Asp Ser Leu Leu
 405 410 415

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GGGCGGCAGT GGTCCTGGTG TGGGTCGTG

48

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CAGGCCTTGA GTCTGAGAA

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 16 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CCTGAAGGAC ACTCAG

16

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CTCAGGAAGA GAGAGACAAG AGG

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ATTGACACTC ACAGTCCTC

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

49

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CGCCGCAGAG ACGTCTCC

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GGTAGAAGGA GACGGAGG

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 16 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

CCCCGGCGCG CCGTTT

16

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 16 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCAGCGACCT CACGAA

16

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CAGCCCACTC GTGTTGGCGG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GTGAAGGTGC CCACGATGA

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

CCGCCAACAC GAGTGGGCTG CC

22

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 16 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CCTTGCGCT GACGGG

16

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 15 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

CCTTCCGCTT CTGGT

15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

GGGCACCTTC ACTCTCTGCT GGTT

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

GCTGGTTGCC CTCTTCGTG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

CCTCCCAGAT CTCTTGCC

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

GCGGAGTCCA GCCGGTGC

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

AAGATATGTT ATCTCCAT

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

CCAGGACGGA AGCAAAGAGG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 19 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

CCTCAGCAGC TGAAGTACC

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 2649 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

CCCCGGAAGC GCTCCACGC CCCGCTGGCC CCTTCCCTGA GCTGGGGGAA GGGACCCGTC	60
CGGAAGGGAG ACCCTTCCTC CCTTCCCCTC CGCCCCACT CGCGCCGCGG GGATGGCTCC	120
GTGGCCTCAC GGGAACGGCT CTGTGGCCTC GTGGCCGGCT GCCCCACCC CGACGCCCGA	180
TGCCGCCAAC ACGAGTGGGC TGCCAGGGGC GCCCTGGGCG GTGGCCTTGG CGGGGGCGCT	240
GTTGGCGCTG GAGGTGCTGG CCACCGTGGG AGGCAACCTG CTGGTCATCG TGGCCATCGC	300
TCGGACGCCA AGACTGCAGA CCATGACCAA CGTGTTCGTG ACGTCGCTGG CCACCGCGGA	360
CCTGGTGGTG GGGCTCCTGG TAGTGCCGCC GGGGCCACC TTGGCGCTGA CGGGCCGCTG	420

GCCTCTGGGC GCCACCGGTT GCGAGCTGTG GACCTCAGTG GACGTGCTGT GTGTGACAGC	480
CAGCATCGAA ACCCTGTGCG CCCTGGCGGT GGACCGCTAC CTGGCCGTGA CCAACCCGCT	540
GCGCTACGGC GCCCTGGTCA CCAAACGGCG CGCCCGGGCG GCAGTGGTCC TGGTGTGGGT	600
CGTGTCCGCC GCGGTGTCTG TCGCGCCCAT CATGAGCAAG TGGTGGCGCG TGGGAGCCGA	660
CGCCGAGGCG CAGCGCTGCC ACTCCAACCC GCACTGCTGC GCCTTCGCCT CCAACATACC	720
CTACGCGCTG CTCTCCTCCT CCGTCTCCTT CTACCTTCCG CTCTGGTGA TGCTCTTCGT	780
CTACGCGCGC GTTTTCCTCG TGGCTACGCG CCAACTGCGC CTGCTGCGCC GGGAGCTGGG	840
CCGCTTCCCG CCCGCGGAGT CTCCGCGGC CGCGTCTCGC TCCCGGTCCC CCGGCCCGGC	900
CCGGCGGTGC GCTTCGCCCG CCGCGGTGCC CTCGACCGC CTGCGGCCCG CGCGCCTCCT	960
GCCTCTGCGG GAGCACCGGG CCCTGCGCAC CTTGGGCCTC ATCGTGGGCA CCTTCACTCT	1020
CTGCTGGTGG CCCTTCTTCG TGGCCAACGT GATGCGCGCT CTCGGGGGGC CCTCTCTGGT	1080
TCCCAGCCCG GCCCTCCTGG CCCTTAACTG GCTGGGCTAC GCCAACTCTG CCTTCAACCC	1140
GCTCATCTAC TGCCCGAGCC CCGACTTCCG CAGCGCTTTC CGCCGCCTAC TGTGCCGCTG	1200
CCGGCGGGAG GAGCACCGCG CCGCCGCTC CCCGCCGGGC GACCCCTCGG CCGCCCCGTC	1260
GGCCCTGACC AGCCCCGCG AGTCCAGCCG GTGCCAAGCG CTCGACGGGT GGGTAACTGA	1320
GGGAGGAGG CCGGCGGTTC AGGGTCAGAA GGCATTCCGA GTCTCTTTGG GCCATTTCTC	1380
AGAGTTTGGG GTTCGGTAGG ATAAGGTGGG GTTGGAGACG TCTCTGCGGC GAAAGAAGGG	1440
GGGACCTGGA GTAGGGAACC AACATGGAAG CCCGACCCCT TCCGTCTCCC GCGGCCGAGC	1500
ACCTGCCCCA GGACGGAAGC AAAGAGGGCA GCAGATTGTT GTTACCCCCA GGACCTAGTG	1560
CGGTCCGGGG AATGCGGCTG TATCCTGAGC CGGCTCGGTC AGCTCCGCAT TTTCTAGCTG	1620
AGTTCTTTGG CCTCCCAGAT CTCTTGCCAC CCCTTGGGCC GGCTTTGACT TGCAGGGAAG	1680
ACGAGAGGCC TTCTCAGACT CAAGGCCTGA GCTCTGGTTT CTTTGAAAGG TGTGATAGCT	1740
ACGGAGTGAT GGTGAGAATC CACTCGAGGT CTGAAGGATA AGCGGGAGTT GGGGAGGGGG	1800
TGAGGACTGT GAGTGTCAAT TCTTCTCCTG GGTAGGAGCA GGCCCCGTTG GAGGTGGGGG	1860
GTGGGTATTT TGTGGCTGGG TGGAGCCCGG ATGCTTCTGC GAGATTGTGG ACAAATGCTT	1920
CCCAGCGTCC CTGACCTTTG CTCCTTCCCT CTA CTGGGCC TGCTCTCCACC CTGTGCCCT	1980
CACCCCAAGA TATGTTATCT CCATTTTCA GGGCTTCTG GGAATCTCT TAGGTCTGA	2040
ACGACAAGAA ACAACTCTGT CAATCCAGAA CTTTGGAAA GCCTCTCCTG GCCTCTGTTT	2100
AGAATGGGCC CTGTGGAAC TCCAGCTGG AAATCTCTGA CCTCCAGAAA CTGATGACTT	2160
GGCCTTGGGG TGGGAGGGCG GAGGTTGGGA GGGGCAACCC TTACCAAGTG AGTTTTCACC	2220
ATCCTCTTGT CTCTCTCTC CTGAGAAGAG TTTTCTAAAC CCCACCCCTG AATTTTACCA	2280
CTACCTCAGC AGCTGAAGTA CCCAGCAGCC TGCTCTCAGC TGCCCTCGGA GTCCCCATTA	2340
GCTTTGGTGG CCCACCTGTC ACCTTGCTCA CTTCTGTGCT GCGTGCTTAG GGCAAAGAGG	2400

TCTCTCCTCC TTCTATTCTT TCTGCTGCCT GTGGACCTGA TGGACCACTG AGTGTCTTC 2460
 AGGCTCGGTG GGCAAGGCTG GGAGCAGAAA GCTATAAAAG GTCCGGGTTT GGGGTTCTGT 2520
 CCCTGACTCC ATCACTACAG ATTCCTAAGC ACCAGCCTTC CCCCCTTTG6 ATACAGGACA 2580
 GCTCTGATCT ACCTCACAGC AGTGTACAGG GGAATTCTCC AGGGTTTGAG GAGGGTGGAG 2640
 GGTGAATTC 2649

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 405 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

Met Ala Pro Trp Pro His Gly Asn Gly Ser Val Ala Ser Trp Pro Ala
 1 5 10 15

Ala Pro Thr Pro Thr Pro Asp Ala Ala Asn Thr Ser Gly Leu Pro Gly
 20 25 30

Ala Pro Trp Ala Val Ala Leu Ala Gly Ala Leu Leu Ala Leu Glu Val
 35 40 45

Leu Ala Thr Val Gly Gly Asn Leu Leu Val Ile Val Ala Ile Ala Arg
 50 55 60

Thr Pro Arg Leu Gln Thr Met Thr Asn Val Phe Val Thr Ser Leu Ala
 65 70 75 80

Thr Ala Asp Leu Val Val Gly Leu Leu Val Val Pro Pro Gly Ala Thr
 85 90 95

Leu Ala Leu Thr Gly Arg Trp Pro Leu Gly Ala Thr Gly Cys Glu Leu
 100 105 110

Trp Thr Ser Val Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu
 115 120 125

Cys Ala Leu Ala Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Thr Asn Pro Leu Arg
 130 135 140

Tyr Gly Ala Leu Val Thr Lys Arg Arg Ala Arg Ala Ala Val Val Leu
 145 150 155 160

Val Trp Val Val Ser Ala Ala Val Ser Phe Ala Pro Ile Met Ser Lys
 165 170 175

Trp Trp Arg Val Gly Ala Asp Ala Glu Ala Gln Arg Cys His Ser Asn
 180 185 190

Pro His Cys Cys Ala Phe Ala Ser Asn Ile Pro Tyr Ala Leu Leu Ser
 195 200 205

Ser Ser Val Ser Phe Tyr Leu Pro Leu Leu Val Met Leu Phe Val Tyr
 210 215 220

55

Ala Arg Val Phe Leu Val Ala Thr Arg Gln Leu Arg Leu Leu Arg Arg
 225 230 235 240

Glu Leu Gly Arg Phe Pro Pro Ala Glu Ser Pro Pro Ala Ala Ser Arg
 245 250 255

Ser Arg Ser Pro Gly Pro Ala Arg Arg Cys Ala Ser Pro Ala Ala Val
 260 265 270

Pro Ser Asp Arg Leu Arg Pro Ala Arg Leu Leu Pro Leu Arg Glu His
 275 280 285

Arg Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu Ile Val Gly Thr Phe Thr Leu Cys
 290 295 300

Trp Leu Pro Phe Phe Val Ala Asn Val Met Arg Ala Leu Gly Gly Pro
 305 310 315 320

Ser Leu Val Pro Ser Pro Ala Leu Leu Ala Leu Asn Trp Leu Gly Tyr
 325 330 335

Ala Asn Ser Ala Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe
 340 345 350

Arg Ser Ala Phe Arg Arg Leu Leu Cys Arg Cys Arg Arg Glu Glu His
 355 360 365

Arg Ala Ala Ala Ser Pro Pro Gly Asp Pro Ser Ala Ala Pro Ala Ala
 370 375 380

Leu Thr Ser Pro Ala Glu Ser Ser Arg Cys Gln Ala Leu Asp Gly Ala
 385 390 395 400

Ser Trp Gly Ile Ser
 405

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

ATGGCTCCGT GGCCTCAC

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

CCGAGGTCCG CCCGCTGAGG

20

510

56

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 28:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

TCGAGACGGT CACCAACTAC TTCA

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 29:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

GTGCGTCACG GCCAGCATC

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 30:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

CTACGCCAAG GAGACGTG

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 31:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

CCAGAAGATC GACAGATC

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 32:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

57

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

GGATAACCTC ATCCCTA

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 33:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

GGGGAGCACA GTGGATGT

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 34:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 14 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

CACTATACAG ACTA

14

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 35:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

CTGTATGTGA AGGAGTC

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 36:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

58

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

CTAGGATATC CTCAGCG

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 37:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

AACGCTGAGG ATATCCTAG

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 38:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

GGACGCCAAA TGCTTCTATG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 39:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 39:

GGTGCAATGA AGTCATGGT

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 40:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 40:

GTCCGTGTTT ACAGCTG

17

59

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 41:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 41:

CAAACCTTACA CGTTCATGC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 42:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 16 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 42:

CACTCAAGTT AAATAG

16

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 43:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 43:

CTGTTGTTGG AGTAGCC

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 44:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 44:

GAGTAGACGA AGACCATG

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 45:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

60

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 45:

CACCGGATCA CGCACAGGG

19

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 46:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 16 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 46:

AACCTGGCGA TGGCCG

16

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 47:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 47:

GCAGTAGATG AGCGGGTTGA AGGCA

25

REVENDICATIONS

1°) Séquences nucléotidiques isolées, caractérisées en ce qu'elles correspondent à une séquence d'ADN codant pour un récepteur β -adrénergique canin sélectionné dans le groupe constitué par l'ADNc codant pour le récepteur β 2-adrénergique canin, de séquence SEQ ID NO:1 et par l'ADN codant pour le récepteur β 3-adrénergique canin, de séquence SEQ ID NO:24.

2°) Sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou un fragment de celle-ci, marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

3°) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est codée par une séquence nucléotidique selon la revendication 1 et est sélectionnée dans le groupe constitué par la SEQ ID NO:2 (récepteur RA- $\text{Ca}\beta$ 2) et la SEQ ID NO:25 (RA- $\text{Ca}\beta$ 3).

4°) Protéine selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle correspond à un récepteur β 3-adrénergique canin et en ce qu'elle présente les activités pharmacologiques d'un récepteur β 3 lorsqu'elle est exprimée de façon transitoire dans les cellules de singe COS-1.

5°) Fragments des protéines selon la revendication 3, d'au moins 6 aminoacides, caractérisés en ce qu'ils correspondent à un épitope apte à produire des anticorps dans des conditions convenables.

6°) Anticorps dirigés spécifiquement contre le récepteur β 3-adrénergique canin ou l'un de ses épitopes selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisés en ce qu'ils ne reconnaissent que ledit récepteur β 3-adrénergique canin ou l'un de ses épitopes et ne

reconnaissent ni les récepteurs $\beta 1$ -, ni les récepteurs $\beta 2$ -adrénergiques canins.

7°) Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une
5 séquence nucléotidique selon la revendication 1.

8°) Vecteur selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est constitué par un vecteur recombinant approprié, comprenant en particulier une origine de répllication dans un micro-organisme hôte convenable,
10 notamment une bactérie ou une cellule eucaryote, au moins un gène dont l'expression permet la sélection soit des bactéries, soit des cellules eucaryotes ayant reçues ledit vecteur, une séquence régulatrice appropriée, notamment un promoteur permettant l'expression des gènes
15 dans lesdites bactéries ou cellules eucaryotes, et dans lequel vecteur est insérée une séquence nucléotidique ou un fragment de séquence selon la revendication 1, lequel vecteur est un vecteur d'expression d'un récepteur $\beta 2$ - ou $\beta 3$ - adrénergique canin.

20 9°) Vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit vecteur est constitué d'un plasmide recombinant d'expression dans lequel est insérée, au niveau d'un lieu multisite, la séquence codant pour le récepteur $\beta 2$ - ou le récepteur $\beta 3$ -adrénergique canin.

25 10°) Vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comporte la séquence codant pour le récepteur $\beta 3$ -adrénergique canin et en ce qu'il a été déposé auprès de la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) tenue par l'INSTITUT PASTEUR, en
30 date du 9 février 1996 sous le n° I-1672.

11°) Cellule hôte appropriée, obtenue par transformation génétique, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un plasmide recombinant d'expression selon l'une quelconque des revendications 7 à 10.

12°) Cellule hôte selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est notamment constituée par les cellules CHO-K1 et les cellules COS-1.

13°) Cellule hôte selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est notamment constituée par une bactérie, notamment *Escherichia coli*.

14°) Procédé de criblage différentiel pour l'étude de l'affinité en liaison de substances et la sélection et l'identification de substances capables de se comporter comme ligand spécifique vis-à-vis d'un récepteur β 3-adrénergique canin selon la revendication 3 ou la revendication 4, lequel procédé comprend :

- la mise en contact de ladite substance avec une cellule hôte préalablement transformée par un plasmide recombinant d'expression selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, laquelle cellule hôte exprime ledit récepteur adrénergique β 3 canin, le cas échéant après induction physique ou chimique appropriée, et laquelle mise en contact est réalisée dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre l'un au moins des sites spécifiques et ladite substance s'il y a lieu,

- la mise en contact de ladite substance avec une cellule hôte préalablement transformée par un plasmide recombinant d'expression du récepteur β 2-adrénergique canin, et

- la détection de la formation éventuelle d'un complexe du type ligand-protéine.

15°) Procédé pour l'étude de l'efficacité et de l'activité d'une substance ayant une activité soit agoniste, soit antagoniste, vis-à-vis du récepteur étudié, lequel procédé comprend :

- la transformation d'une cellule hôte appropriée par un plasmide recombinant d'expression selon l'une quelconque des revendications 7 à 10 exprimant le récepteur β 3-adrénergique canin ;

- la culture de la cellule hôte transformée, dans des conditions permettant l'expression du récepteur $\beta 3$ codé par la séquence nucléotidique, et le transfert du récepteur $\beta 3$ exprimé vers la membrane de ladite cellule, de sorte que les séquences transmembranaires du récepteur $\beta 3$ soient exposées à la surface de la cellule hôte transformée ;

- la mise en contact de ladite cellule hôte transformée avec ladite substance ; et

10 - la mesure de l'accumulation du second messager AMPc, induite par la liaison de ladite substance sur son récepteur et la stimulation de l'effecteur adénylyl cyclase par l'intermédiaire d'une protéine G.

16°) Kit pour la détection de l'affinité de liaison éventuelle d'un ligand pour un récepteur selon la revendication 3 ou la revendication 4 et/ou pour la détection de l'activité dudit ligand vis-à-vis dudit récepteur, lequel kit comprend :

- une culture de cellules hôtes transformées par un plasmide recombinant d'expression selon l'une quelconque des revendications 7 à 10 ;

- éventuellement, si nécessaire, des moyens physiques ou chimiques pour induire l'expression d'un récepteur $\beta 3$ canin codé par une séquence nucléotidique selon la revendication 1, contenue dans un plasmide recombinant dont le promoteur est inductible ;

- un ou plusieurs ligands témoins ayant des affinités déterminées pour ledit récepteur $\beta 3$;

- l'affinité de ladite substance pour le récepteur est mesurée par compétition de la liaison du radioligand par des concentrations croissantes de ladite substance ; et

- des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de l'activité biologique du récepteur $\beta 3$ exprimé.

17°) Réactif, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, les séquences SEQ ID NO:3-23 et les séquences SEQ ID NO:27-
s 46.

1/12

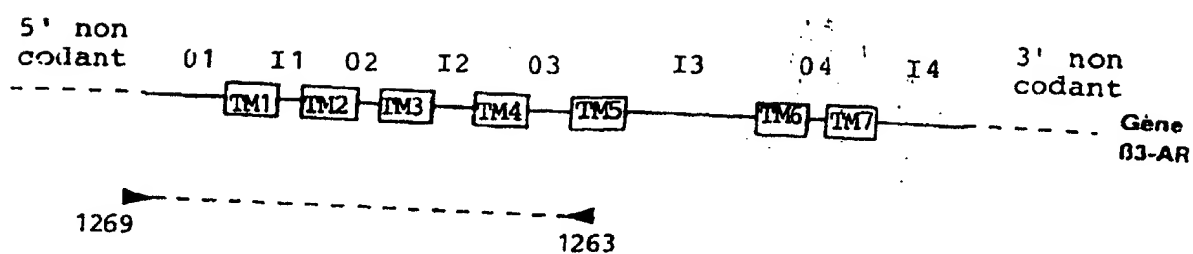


FIGURE 1

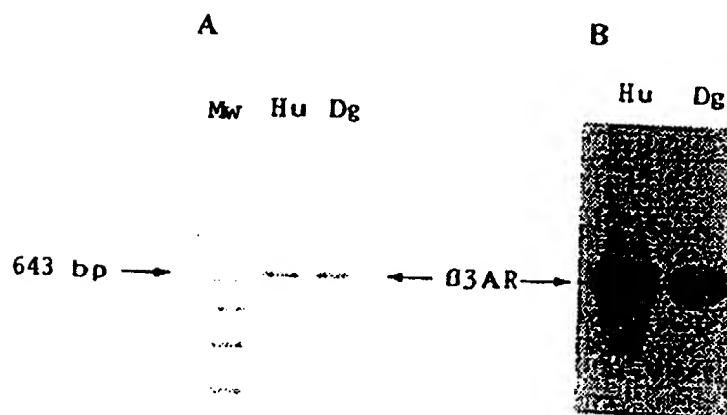


FIGURE 2

2/12

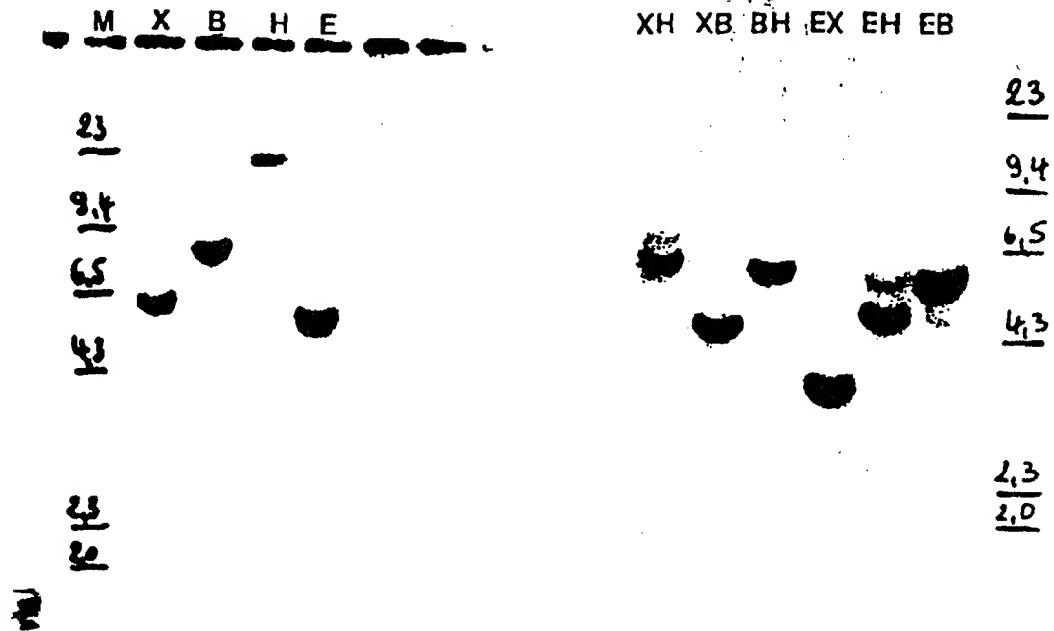


FIGURE 3

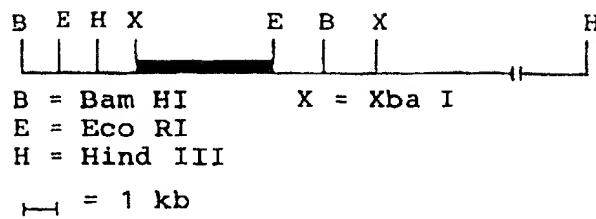


FIGURE 4

3/12

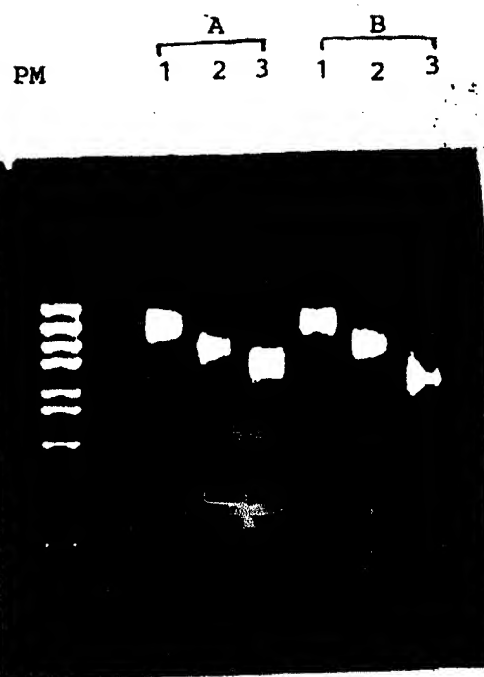


FIGURE 5

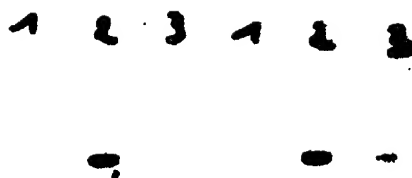


FIGURE 6

4/12

LYA sequence 2649 b.p. CCCGGGAACCC ... GAGGCTGATTC linear

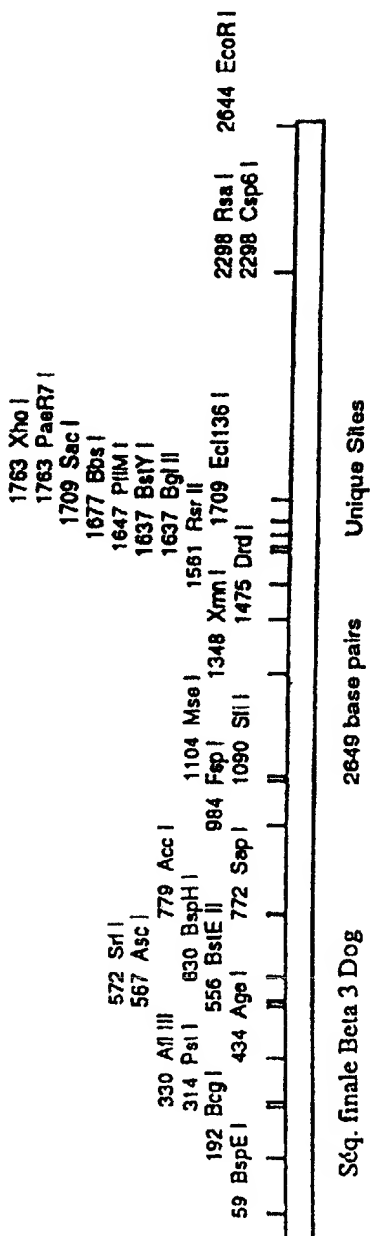


FIGURE 7

5/12

DNA sequence 2649 b.p. CCCGGGAAGGCG ... GAGGCTGAATTC linear

Enzyme	Site	<--	Pos.	-->
BspE I	t/ccgga	58	59	2591
Bcg I	cgannnnntgc	191	192	2458
Pst I	ctgca/g	313	314	2336
Afi III	a/crygt	329	330	2320
Age I	a/ccggt	433	434	2216
BstE II	g/gtnacc	555	556	2094
Asc I	gg/cggcc	566	567	2083
Srf I	ggcc/gggc	571	572	2078
BspH I	t/catga	629	630	2020
Sap I	gctcttc 1/4	771	772	1878
Acc I	gt/mkac	778	779	1871
Fsp I	tgc/gca	983	984	1666
Sfi I	ggccnnnn/nggcc	1089	1090	1560
Mse I	t/taa	1103	1104	1546
Xmn I	gaann/nnttc	1347	1348	1302
Drd I	gacnnnn/nngtc	1474	1475	1175
Rsr II	cg/gwccg	1560	1561	1089
Bgl II	a/gatct	1636	1637	1013
BstY I	r/gatcy	1636	1637	1013
PflM I	ccannnn/ntgg	1646	1647	1003
Bbs I	gaagac 2/6	1676	1677	973
Ecl136 I	gag/ctc	1708	1709	941
Sac I	gagct/c	1708	1709	941
Paer7 I	c/tcgag	1762	1763	887
Xho I	c/tcgag	1762	1763	887
Csp6 I	g/tac	2297	2298	352
Rsa I	gt/ac	2297	2298	352
EcoR I	g/aattc	2643	2644	6

FIGURE 8

6/12

[illegible]

Les * indiquent les acides aminés conservés inter-espèces

FIGURE 9

7/12

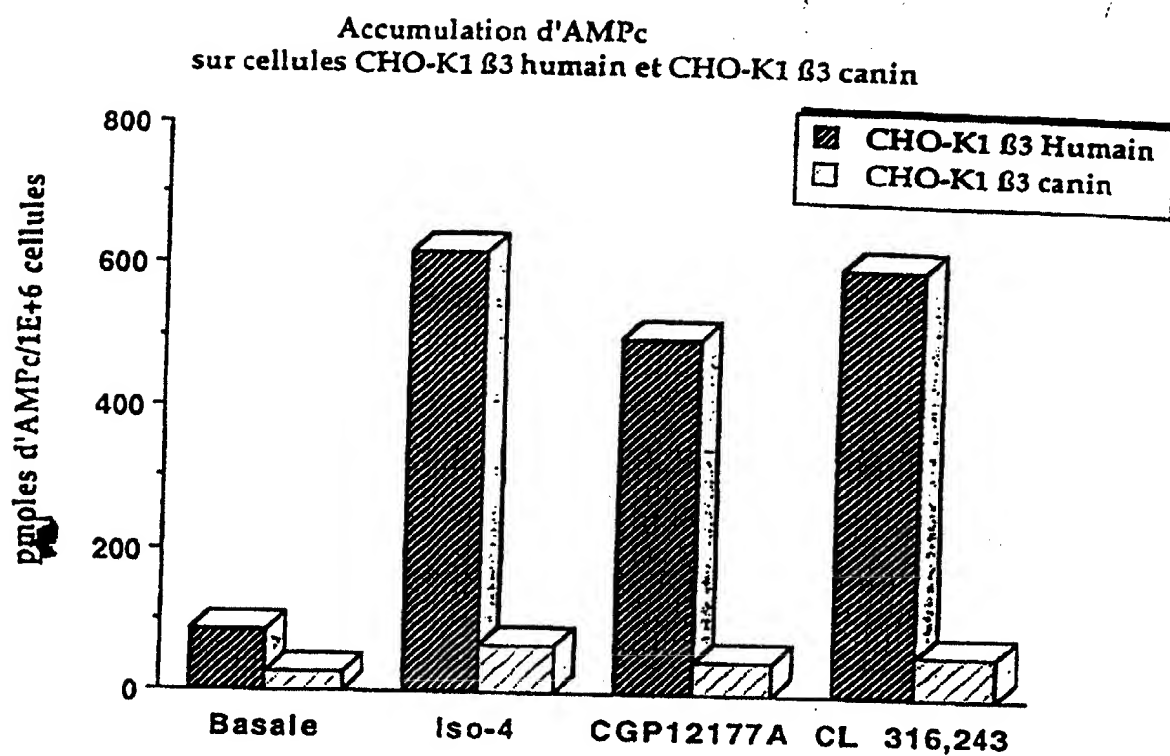


Figure 10

8/12

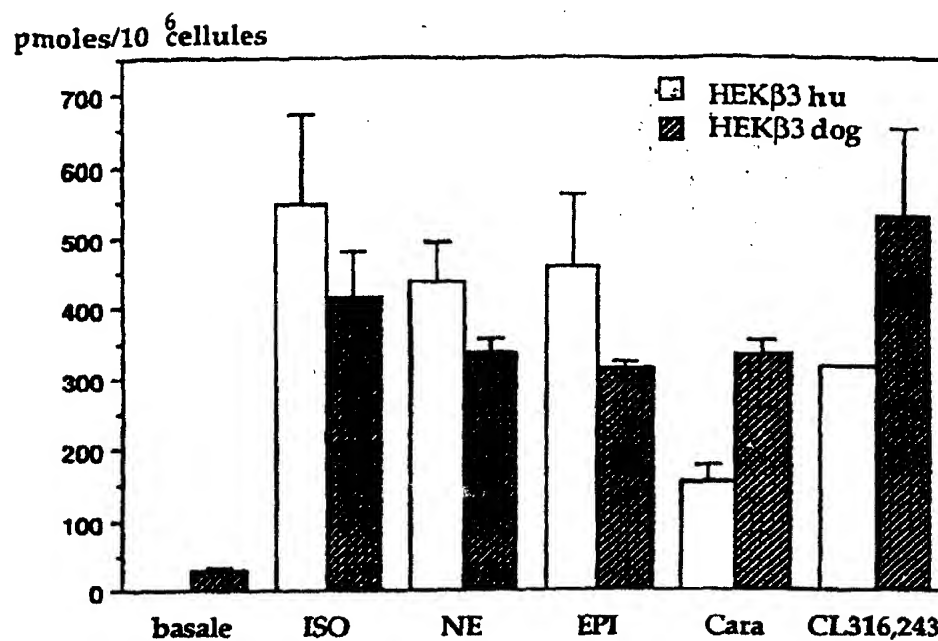


FIGURE 11

9/12

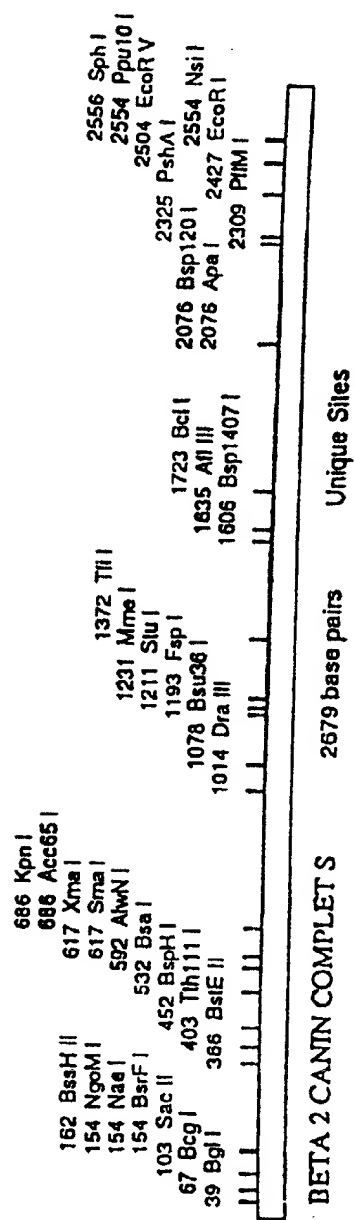


FIGURE 12

10/12

BETA 2 CANIN COMPLET S -> Unique Sites

DNA sequence 2579 b.p. GCACTCCGGGGC ... ATTAACAAAC linear

Enzyme	Site	<--	Pos.	-->
Bgl I	gcaaaaaa/aggc	38	39	2641
Bcg I	cgaaaaaaatgc	46	67	2613
Sac II	ccgc/gg	102	103	2577
BsrF I	r/ccggg	153	154	2526
Nae I	gcc/ggc	153	154	2526
NgoM I	g/ccggc	153	154	2526
BssH II	g/ccggc	161	162	2518
BstE II	g/gtaacc	365	366	2314
Tth111 I	gacn/nngtc	402	403	2277
BspH I	c/catga	451	452	2228
Bsa I	gggttc 1/5	531	532	2148
AlwN I	cagaaa/ctg	591	592	2088
Sma I	ccc/ggg	616	617	2063
Xma I	c/ccggg	616	617	2063
Acc65 I	g/gtacc	685	686	1994
Kpn I	gggtac/c	685	686	1994
Dra III	cacaaa/gcg	1013	1014	1666
Bsu36 I	cc/taagg	1077	1078	1602
Fsp I	tgc/gca	1192	1193	1487
Stu I	agg/cct	1210	1211	1469
Mme I	cccrac 20/18	1230	1231	1449
Tfi I	g/awtc	1371	1372	1308
Bsp1407 I	t/gtaca	1605	1606	1074
Afl III	a/crygt	1634	1635	1045
Bcl I	t/gatca	1722	1723	957
Apa I	gggcc/c	2075	2076	604
Bsp120 I	g/gggcc	2075	2076	604
PflM I	ccaaaaa/ntgg	2308	2309	371
PshA I	gacaa/nngtc	2324	2325	355
EcoR I	g/aattc	2426	2427	253
EcoR V	gat/atc	2503	2504	176
Nsi I	atgca/t	2553	2554	126
Ppu10 I	a/tgcat	2553	2554	126
Sph I	gcatg/c	2555	2556	124

FIGURE 13

11/12

[illegible]

FIGURE 14

12/12

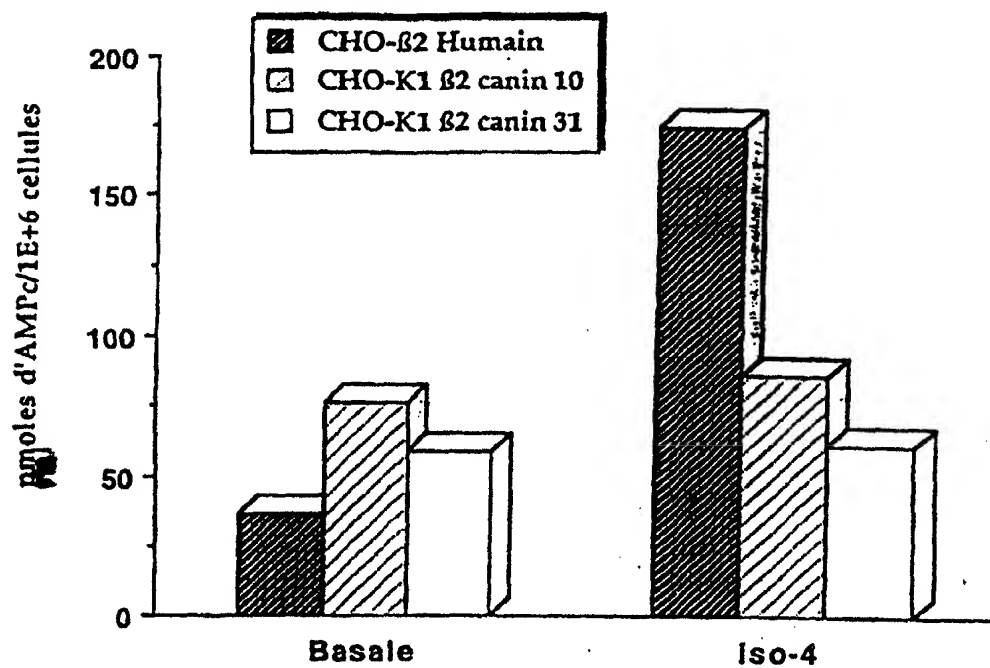
Accumulation d'AMPc sur cellules CHO β 2 humain et CHO-K1 β 2 canin

Figure 15